

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EXTRAÇÃO DE FORMONONETINA DA PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO ANTIDISCINÉTICO
EM ROEDORES**

Tese de doutorado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título
de Doutor em Saúde e Ambiente, na
área de concentração Saúde e
Ambiente.

REINALDO VIANA BELO NETO

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Margarete Zanardo Gomes

Coorientador

Prof. Dr. Anderson Alles de Jesus

Aracaju
Setembro – 2023

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EXTRAÇÃO DE FORMONONETINA DA PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO ANTIDISCINÉTICO
EM ROEDORES**

REINALDO VIANA BELO NETO

Aracaju
Setembro – 2023

B452e Belo Neto, Reinaldo Viana
Extração de formononetina da própolis vermelha brasileira e avaliação de
seu efeito antidiscinético em roedores / Reinaldo Viana Belo Neto; orientação
[de] Prof.^a Dr.^a Margarete Zanardo Gomes, Prof. Dr. Anderson Alles de Jesus
– Aracaju/ SE: UNIT, 2023.

75 f.il; 30 cm

Tese(Doutorado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes 2023

1.Discinesia tardia 2. Isoflavonas 3. Doença de Parkinson I. Reinaldo Viana
Belo Neto II. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). III. Jesus, Anderson Alles
(orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU:616.858

Gislene Maria S. Dias CRB-5/1410

EXTRAÇÃO DE FORMONONETINA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO ANTIDISCINÉTICO EM ROEDORES

Reinaldo Viana Belo Neto

EXAME DE DEFESA DE DOUTORADO SUBMETIDO À BANCA
EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E
AMBIENTE.

Aprovada por:

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **ANDERSON ALLES DE JESUS**
Data: 08/04/2024 16:42:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Anderson Alles De Jesus, D.Sc.
(Co-orientador)

Documento assinado digitalmente
 **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior**
Data: 09/04/2024 11:35:33-0300
CPF: ***.876.344-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.

Universidade Federal de Santa Catarina

Documento assinado digitalmente
 **KLEBSON SILVA SANTOS**
Data: 08/04/2024 16:26:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Klebson Silva Santos, D.Sc.
Instituto de Tecnologia e Pesquisa

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA CORDEIRO CARDOSO**
Data: 09/04/2024 14:05:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

Universidade Tiradentes

Documento assinado digitalmente
 **MARIA NOGUEIRA MARQUES**
Data: 09/04/2024 20:17:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Nogueira Marques, D.Sc.

Universidade Tiradentes

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que acreditam nos seus sonhos, pois um dia eles irão se concretizar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiro a Deus por ter me dado força, paciência e persistência. Agradecer a minha família, meus pais, Marta Angelica e Reinaldo Viana, meu irmão, Victor, minha esposa, Thamires, meus filhos, Bernardo e Gabriel, meus avós, que sempre me apoiaram, me motivaram a continuar a seguir meu sonho tanto na graduação quando na pós-graduação, eles que nos momentos mais difíceis entendiam o sacrifício de não poder estar em algum encontro de família.

Agradecer a todos os familiares, tios e tias, primos e primas e o agradecer aos meus amigos de infância que mesmo os caminhos afastando estavam ali apoiando e torcendo.

Agradecer aos meus amigos que a pesquisa me deu durante meus dez anos com a família LIMPE Lorena, Ana Maria, Bruno, Rafael que tornaram a jornada mais leve e mesmo quando pesadas sabia que poderia contar com eles, seja para uma gavagem como também para desabafar quando nada saia como planejado. Não posso esquecer também dos novos amigos Tati, Enzo, Ed. Falando em família LMPE não posso deixar de agradecer a todos que contribuírem de alguma forma na minha construção como professora Nely, professor Ricardo e seus gritos de carinho, professora Juliana Cardoso também que fez parte.

E não posso deixar de agradecer de forma muito especial a professora Margarete que desde o início disso tudo me deu um voto de confiança lá em 2013 para eu começar como aluno de iniciação científica e desde então já se passaram 10 anos de uma construção, na base conversa, broncas, apontamentos, puxões de orelha. Mas hoje entendo que tudo isso foi necessário, obrigado professora por ser tão compreensiva quando precisava ser como também foi firme quando necessitava ser.

Não posso esquecer dele que chegou chegando, para poder me frear e respirar meu coorientador Anderson, que me ensinou uma frase que vou levar para o resto da vida " não importa o que vai vir de recompensa, só quero saber de uma coisa, vou poder ter um amigo daqui para frente?" E dessa frase em diante esse rapaz se tornou apenas meu coorientador, mas sim meu amigo, amigo de trabalho, de surf, de conselhos. Só tenho de agradecer todas as experiências que pude desfrutar. Se esqueci de alguém desculpa.

E agradecer aos animais que sem eles nada disso poderia ser possível. E a Júlio que sempre esteve ali chegando junto e ajudando com técnicas e liberando os animais.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.2 Objetivo geral	18
2.3 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Doença de Parkinson (DP)	19
3.2 Lesões da via nigroestriatal com 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)	21
3.3 Testes Comportamentais	22
3.3.1 Movimentos involuntários anormais	22
3.3.2 Teste de Comportamento Rotatório	23
3.3.3 Teste do Cilindro.....	23
3.4 Tratamento da DP com 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA).....	24
3.5 Discinesias induzidas por L-DOPA.....	27
3.6 Tratamento das LIDs com Amantadina	28
3.7 Própolis vermelha.....	37
3.8 Métodos de extração de própolis vermelha	38
3.9 Caracterização Química de Extratos	39
3.9.2 Cromatografia líquida de alta performance	40
3.9.3 Termogravimetria.....	41
3.10 Propriedades biológicas	41
3.11 Formononetina	42
3.12 Biochanina A	44
4 METODOLOGIA	46
4.1 Obtenção da própolis vermelha.....	46
4.2 Preparo da amostra de própolis vermelha	46
4.3 Extração de PV por líquidos pressurizados	46
4.4 Cromatografia líquida de alta performance	47
4.5 Termogravimetria (TGA).....	48
4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
4.7 Ensaio <i>in vivo</i>	48
4.7.1 Aspectos éticos	48
4.7.2 Obtenção da formulação contendo formononetina	49
4.7.3 Desenho experimental e formação dos grupos.....	49
4.7.4 Procedimentos cirúrgicos: estereotaxia.....	50

4.7.5 Avaliação comportamental.....	51
4.7.5.1 Teste de comportamento rotatório (CR).....	51
4.7.5.2 Teste de movimentos involuntários anormais (MIA).....	51
4.7.5.3 Teste do cilindro.....	52
4.7.7 Avaliação imunohistoquímica	52
4.7.8 Análises de imagens	53
5 Resultados e Discussão	55
5.1 Caracterização do extrato de própolis vermelha.....	55
5.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	55
5.1.2 Microscopia de varredura.....	58
5.1.3 Termogravimétrica (TGA)	58
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	60
5.2.1 Avaliação comportamental.....	60
5.1.2 Avaliação histológica	63
6 Conclusão.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilase
AMAN	Amantadina
ATP	Trifosfato de adenosina
COMT	Inibidores da catecol-O-metiltransferase
COX 2	Cicloxygenase-2
DAT	Transportadores de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2-difenil-2-picrilidrazil
EAG	Ácido gálico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FPM	Feixe prosencefálico medial
FN	Formononetina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Síntese de óxido nítrico induzível
HVA	Ácido homovanílico
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LID	Discinesias induzida por L-DOPA (do inglês <i>L-dopa-induced dyskinesia</i>)
LPS	Lipossacarídeo
MAOB	Monoamina oxidase B
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MIA	Movimentos involuntários anormais
MMP-3	Metaloproteinase de matriz-3
MPO	Mieloperoxidase
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina
NB	Núcleos da base
NCAM	molécula de adesão de células neuronais

NET	Transportador de norepinefrina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PLE	Extração por líquidos pressurizados
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra parte compacta
SNpr	Substância negra parte reticulada
SOD	Superóxido dismutase
STN	Núcleo subtalâmico
TH	Tirosina hidroxilase
TBS	do inglês <i>Tris[hydroxymethylaminomethane]</i>
Tnf-α	Fator de necrose tumoral α
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TVMA	Transportador sináptico de monoamina vesicular
VL	Núcleo ventro-lateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de circuitos dos núcleos da base representando	27
Figura 2: Aparato experimental para extração de líquido pressurizado.	47
Figura 3: Representação esquemática do desenho experimental ao longo do tempo.	50
Figura 4: Cromatogramas do HPLC:	57
Figura 5: Imagem por microscopia de varredura.	58
Figura 6: Curva de termogravimétrica do extrato de própolis vermelha em baixa temperatura	59
Figura 7: Resultados do teste de movimentos involuntários anormais.	61
Figura 8: Resultados do teste do cilindro realizado ao 21º dia de administração dos tratamentos.....	63
Figura 9: Resultados da quantificação de células imunorreativas para tirosina- hidroxilase.	64
Figura 10: Resultados da quantificação de células imunorreativas para proteína glial fibrilar ácida presente em astrócitos.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estratégias para o tratamento de DP	26
Quadro 2: Gradientes utilizados na amostra do extrato.	48
Quadro 3: Formulação contendo FN.....	49
Quadro 4: Esquema de distribuição dos grupos experimentais.....	50

RESUMO

A reposição dopaminérgica através da administração do precursor L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) é o principal tratamento para a doença de Parkinson (DP), porém o uso prolongado deste medicamento causa efeitos adversos na forma de movimentos involuntários anormais (MIA) denominados discinesias. Um estudo anterior mostrou que o extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV, v.o.) diminuiu as discinesias induzidas por L-DOPA em roedores. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito antidiscinético da formononetina (FN), um dos marcadores químicos do EHPV, utilizando ensaio pré-clínico para estudo da DP. Foi empregado um método extração por líquidos pressurizados e em baixas temperaturas (-30°C a 30°C) para a obtenção de um extrato rico em FN e as amostras foram caracterizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o ensaio biológico *in vivo*, 20 ratos Wistar machos adultos (n = 5/grupo) receberam injeção estereotáxica de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 16 µg; 3 µL) ou solução salina (grupo Sham) no feixe prosencefálico medial. Vinte e um dias após os procedimentos cirúrgicos, foi realizado o teste do comportamento rotatório induzido por apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.) para confirmação da efetividade da lesão. Em seguida, os ratos receberam L-DOPA (25 mg/kg + benserazida 10 mg/kg, diluída em solução salina 0,9%, v.o.), concomitantemente ao tratamento com FN (60 mg/kg, v.o., Grupo L-DOPA/FN) ou veículo (L-DOPA/VC), duas vezes ao dia durante 21 dias. Outro grupo lesionado não foi tratado com L-DOPA e recebeu solução salina (grupo 6-OHDA/VC). Foram avaliados os movimentos involuntários anormais (MIA, parâmetros motores, movimentos axiais, de membros e orofaciais) no primeiro (1º, tratamento agudo) e no vigésimo primeiro (21º, sub crônico) dia de tratamento. O teste do cilindro também foi realizado ao final de 21 dias, para avaliar a atividade motora, e em seguida os ratos foram eutanasiados. Os encéfalos foram removidos para processamento histológico e posterior análise imunohistoquímica da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH: marcador de neurônios dopaminérgicos) e da proteína glial fibrilar ácida presente em astrócitos (GFAP: marcador de resposta glial). Foi avaliado o número de células marcadas nas regiões dos núcleos da base (substância negra *pars compacta* - SNc - e estriado dorsal). Para análise estatística foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni (avaliação de MIA) ou ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (teste do cilindro, histologia) (P < 0,05). Observou-se (HPLC) que as maiores concentrações de isoflavonas foram obtidas nas faixas de temperatura de 0 °C e -10 °C (FN: 0,12 ug/mL e 0,09 ug/mL; Biochanina A: 14,44 ug/mL e 12,89 ug/mL /mL, respectivamente). Dados de MEV e TAG mostraram que, mesmo quando submetido a baixas temperaturas, o extrato mantém sua estrutura molecular e orgânica. O teste *in vivo* revelou diminuição dos MIA após 21 dias de tratamento no grupo L-DOPA/FN em comparação ao grupo L-DOPA/VC, sem alteração do efeito antiparkinsoniano da L-DOPA observado no teste do cilindro. O tratamento com FN também promoveu a preservação do número médio de neurônios marcados para TH no SNc e a diminuição da resposta astrocitária no estriado dorsal, ambos em relação aos grupos 6-OHDA/VC e L-DOPA/VC. Em conclusão, os resultados indicaram que a FN foi extraída eficientemente da própolis vermelha utilizando líquidos pressurizados em baixas temperaturas, e que sua administração *in vivo* na dose de 60 mg/kg promoveu efeitos antidiscinético, neuroprotetor e anti-neuroinflamatório em ratos hemiparkinsonianos submetidos a tratamento crônico com L-DOPA.

Palavras chaves: Discinesia Tardia; Isoflavonas; Doença de Parkinson.

Abstract

The dopaminergic replacement through the administration of the precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) is the main treatment for Parkinson's disease (PD), however, prolonged use of this substance causes adverse effects in the form of abnormal involuntary movements (AIMs) named dyskinesias. A previous study showed that the hydroethanolic extract of red propolis (HERP, p.o.) decreased L-DOPA-induced dyskinesias in rodents. In this work, we aimed to evaluate the antidyskinetic effect of formononetin (FN), one of the chemical markers of HERP, in a pre-clinical model of PD. An extraction method using pressurized liquids at low temperatures (-30°C to 30°C) was used to obtain an extract rich in FN and the samples were characterized by high performance liquid chromatography (HPLC), thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM). For the *in vivo* biological assay, 20 adult male Wistar rats (n = 5/group) received a stereotactic injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 16 µg; 3 µL) or saline (Sham group) into the medial forebrain bundle. Twenty-one days after the surgical procedures, the apomorphine-induced rotational behavior (0.5 mg/kg, s.c.) test was carried out and the effectiveness of the lesion was confirmed. Then, rats received L-DOPA (25 mg/kg + benserazide 10 mg/kg, diluted in 0.9% saline solution, p.o.), concomitantly with the treatment with FN (60 mg/kg, p.o., L-DOPA/FN group) or vehicle (L-DOPA/VC), twice a day for 21 days. Another injured group received saline solution instead L-DOPA (6-OHDA/VC group). They were evaluated the abnormal involuntary movements (AIMs, motor, axial, limb and orofacial parameters) at the first (1, acute) and twenty-first (21, sub-chronic) day of treatments. The cylinder test was also performed at the end of 21 days, to evaluate motor activity, and then the rats were euthanized. The brains were removed for histological processing and subsequent immunohistochemical analysis of the expression of tyrosine hydroxylase (TH: marker of dopaminergic neurons) and glial fibrillary acidic protein present in astrocytes (GFAP: marker of glial response). The number of labeled neural cells in the basal ganglia regions (*substantia nigra* pars compacta – SNc - and dorsal striatum) were evaluated. For statistical analysis they were used two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test (MIA) or one-way ANOVA with Tukey post-test (cylinder test, histology) ($P < 0.05$). It was observed (HPLC) that the highest concentrations of isoflavones were obtained in the temperature ranges of 0 °C and -10 °C (FN: 0.12 µg/mL and 0.09 µg/mL; Biochanin A: 14.44 µg /mL and 12.89 µg/mL, respectively). SEM and TAG data showed that, even when subjected to low temperatures, the extract maintains its molecular and organic structure. The *in vivo* test revealed a decrease in MIA after 21 days of treatment in the L-DOPA/FN group compared to the L-DOPA/VC group, with no change in the antiparkinsonian effect of L-DOPA, observed in the cylinder test. Treatment with FN also promoted the preservation of the average number of neurons labeled for TH in the SNc and the decrease in the astrocytic response in the dorsal striatum, both in relation to the 6-OHDA/VC and the L-DOPA/VC groups. In conclusion, FN was efficiently extracted from red propolis by using pressurized liquids at low temperatures, and its *in vivo* administration at 60 mg/kg promoted antidyskinetic, neuroprotective and anti-neuroinflammatory effects in hemiparkinsonian rats subjected to chronic treatment with L-DOPA.

Keywords: Tardive Dyskinesia; Isoflavones; Parkinson's Disease.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em incidência no mundo, afetando aproximadamente 1% dos adultos com mais de 60 anos, sendo o envelhecimento o principal fator de risco para seu surgimento (MARINO *et al*, 2020). As manifestações clínicas dos pacientes com DP são divididas em sintomas motores (instabilidade postural, tremores, rigidez e bradicinesia) e não motores (distúrbios psiquiátricos, autonômicos, de sono, distúrbios cognitivos, distúrbios da deglutição e distúrbios da fala) (BLOEM *et al*, 2021; SCHAPIRA *et al*, 2017).

A principal estratégia para o tratamento dos sintomas da DP é baseada na terapia de reposição de dopamina através da administração do precursor dopaminérgico L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (SZÁSZ *et al.*, 2022; CARTA *et al.*, 2017). No entanto, o uso prolongado de L-DOPA leva ao surgimento de efeitos adversos, caracterizados por movimentos involuntários anormais conhecidos como discinesias induzidas por L-DOPA (LID, do inglês *levodopa-induced dyskinesias*) (BORDIA *et al*, 2019; SEBASTIAN NUTTO *et al.*, 2016). O antagonista de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) amantadina tem sido proposto como fármaco antidiscinético, mas sua administração é associada a depressão e alucinações (OERTEL *et al.*, 2017). Assim, se faz necessária a busca de novas estratégias para redução das LID.

Os mecanismos que desencadeiam as discinesias não são completamente elucidados devido à sua complexa etiopatogenia. Estudos mostram que as LID podem ocorrer pela metabolização da dopamina (acumulada pelo uso crônico da L-DOPA), realizada por neurônios e por astrócitos, que leva à formação de espécies reativas de oxigênio. Estes produtos ativam células microgliais que liberam mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PISANU *et al*, 2018; CARTA *et al.*, 2017) e as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) (CALABRESE *et al.*, 2018). Observa-se aumento da atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX 2) (BORTOLANZA *et al.*, 2015) e da expressão da enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) (HASSANZADEH; RAHIMMI, 2019). Em adição, sabe-se que os astrócitos e micróglia expressam receptores catecolaminérgicos e glutamatérgicos e que podem participar da modulação da transmissão dopaminérgica (CARTA *et al.*, 2017). Dessa forma, o manejo da neuroinflamação e, mais especificamente, de substâncias liberadas por células da glia, pode representar um novo foco terapêutico para o tratamento da LID (PISANU *et al*, 2018).

Para tal fim, estudos com produtos naturais e seus constituintes isolados (DOO *et al.*; 2014), a exemplo dos flavonoides, têm sido realizados (LU *et al.*, 2018). A formononetina (FN) é uma isoflavona com atividades biológicas antiapoptótica (WANG *et al.*, 2018), anti-inflamatória (LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015) e antioxidante sobre o sistema nervoso central

(TIAN *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018), representando assim um interessante alvo a ser pesquisado para dirimir as discinesias. Em estudo *in vivo*, a FN promoveu melhora em testes cognitivos em roedores, associada à diminuição dos níveis de citocinas IL-1 β e TNF- α , diminuição da resposta pró-inflamatória mediada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B) e aumento da resposta anti-inflamatória mediada por Nrf-2 no hipocampo (WANG *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2019). Também foram observadas evidências *in vitro* de que a FN modula a via de sinalização inflamatória mediada por NF- κ B, com diminuição nos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , nitritos e prostaglandina 2 (EL-BAKOUSH, OLAJIDE, 2018).

A FN está presente em alta concentração no extrato hidroetanólico da própolis vermelha brasileira (EHPV), sendo considerada um marcador químico da própolis vermelha sergipana (LOPEZ *et al.*, 2014). De fato, estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa mostrou que a administração oral de EHPV (10 mg/kg) teve efeito antidiscinético após lesão da via dopaminérgica nigroestriatal em ratos, acompanhado de um possível efeito neuroprotetor e neurotrófico (BARROSO, 2019).

Tal própolis vermelha sergipana se destaca por sua ampla gama de atividades biológicas e por ser um produto da biodiversidade regional vinculado à atividade apícola - que contribui para o desenvolvimento da região de forma sustentável (FREIRES *et al.*, 2016). Estudos têm mostrado que a faixa de dose com efeitos neuroprotetores para o EHPV situa-se entre 10 e 30 mg/kg em modelos animais de lesão medular, hemiparkinsonismo, inflamação e lesão de nervo periférico (VASCONCELOS *et al.*, 2021; BARBOSA *et al.*, 2016; LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015) e a concentração de FN encontrada nesses extratos apresentou-se na faixa de 23 a 54 μ g/mg de extrato. No entanto, de acordo com a literatura, a dose de FN com efeitos farmacológicos sobre o sistema nervoso situa-se no intervalo de 30 a 60 mg/kg (YU *et al.*, 2022; VASCONCELOS *et al.*, 2021). Assim, é desejável utilizar técnicas de extração da própolis vermelha que permitam obter maiores quantidades de FN e ao mesmo tempo definir a dose de FN que pode ser útil no tratamento das discinesias.

Neste sentido, a composição química e as propriedades biológicas da própolis são susceptíveis a variações em função da técnica empregada para a sua extração (BARRETO *et al.* 2022; SENA-LOPES *et al.*, 2018). Os processos convencionais de extração de compostos químicos em amostras de própolis vermelhas comumente utilizados empregam solventes como etanol, água, hexano, acetato de etila e clorofórmio. Estas técnicas apresentam limitações como o uso de substâncias nocivas ao meio ambiente, demanda de um longo tempo de extração e obtenção de extratos contendo resíduos indesejáveis (IDRUS *et al.*, 2018).

Outras técnicas viabilizam a extração e remoção de compostos bioativos de forma mais pura e rápida. Dentre estes, destaca-se a extração por líquidos pressurizados (ELP) como um método eficaz para a obtenção de isoflavonas (MORAS *et al.*, 2017). A ELP em

baixas temperaturas é uma técnica que pode reduzir a perda de compostos de interesse e o tempo de extração, permitindo melhor desempenho na separação e o controle da quantidade desses compostos (GETACHEW *et al*, 2022).

Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho é avaliar os efeitos da FN administrada por via oral frente às discinesias induzidas por L-DOPA em roedores. Considerando-se ainda a importância de agregar conhecimento científico e valor econômico a um produto da biodiversidade regional, foi delineado um objetivo específico voltado a obter um extrato de própolis vermelha com alta concentração dessa isoflavona. Propõe-se, portanto, um estudo que integra a otimização da extração de compostos bioativos da própolis vermelha e o estudo de sua utilização em ensaio pré-clínico para estudo da DP.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Otimizar a extração de FN da própolis vermelha brasileira e avaliar os efeitos de sua administração oral sobre as discinesias induzidas por L-DOPA em ensaio pré-clínico.

2.3 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar um extrato de própolis vermelha rico em isoflavonas, especificamente FN, utilizando método de extração por líquidos pressurizados em baixas temperaturas;
- Analisar os efeitos da administração oral de FN sobre as discinesias induzidas por L-DOPA e sobre a atividade motora em roedores, utilizando testes de comportamento;
- Avaliar modificações na expressão de neurônios dopaminérgicos e a reação astrócitaria no encéfalo após tratamentos, por meio de ensaio imunohistoquímico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença de Parkinson (DP)

A doença de Parkinson (DP) é um dos distúrbios mais incapacitantes que acomete o sistema nervoso central. Caracteriza-se pela perda (neurodegeneração) crônica dos neurônios dopaminérgicos (DA) na substância negra compacta (SNpc), no mesencéfalo (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; TRAN *et al.*, 2018). A degeneração e a perda dos terminais de axônios no núcleo caudado/putâmen (estriado dorsal), com consequente redução dos níveis de dopamina nesta região, relaciona-se aos sintomas motores clássicos da PD: rigidez, tremor em repouso, bradicinesia, perda de reflexos posturais, postura flexionada e o fenômeno da marcha congelante (FU *et al.*, 2022; BAGGA; DUNNETT; FRICKER, 2015; WEI *et al.*, 2018). Além deste, ocorrem alterações no padrão de sono, problemas neuropsiquiátricos e disfunções cognitivas, os chamados sintomas não-motores (GULUNAY *et al.* 2020).

A dopamina é um neurotransmissor do grupo das catecolaminas que regula a transmissão sináptica nos núcleos da base (NB), responsáveis pelo controle e produção dos movimentos (LIAO *et al.*, 2017; JUÁREZ OLGUÍN *et al.*, 2016; YOU *et al.*, 2018). Os NB possuem uma localização funcional no telencéfalo sendo classificados como: 1) núcleos de entrada, 2) núcleos de saída e 3) núcleos intrínsecos (FAZL; FLEISHER, 2018), tendo seus elementos principais o (i) estriado formado pelos núcleos caudado e putâmen, separados pela cápsula interna, além do núcleo accumbens, (ii) o globo pálido localiza-se medialmente ao putâmen, lateral à cápsula interna e divide-se em segmentos externo (lateral - GPe) e interno (medial - GPi), (iii) o núcleo subtalâmico (STN) está localizado no diencéfalo e a (iv) substância negra, localizada na parte superior do mesencéfalo sendo dividida em parte compacta (SNpc) e reticulada (SNpr) (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN, 2015).

O estriado representa o principal núcleo de entrada do circuito neuronal e recebe informações aferentes glutamatérgicas excitatórias do córtex, bem como inervações dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, e transferem as informações aos núcleos de saída (GPi e SNpr) (BOUABID *et al.*, 2016), que por sua vez contraem sinapses com o tálamo e núcleos pontinhos no tronco encefálico. Os núcleos intrínsecos, responsáveis pela retransmissão de informações os núcleos de saída, são constituídos pelo GPe, STN e SNpc (FAZL; FLEISHER, 2018).

As projeções dos núcleos de entrada para os de saída são divididas em duas vias, uma "direta" (monosináptica) e outra "indireta" (polissináptica) (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN, 2015). Na via direta, a ativação de neurônios do estriado que produzem os neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA) e a substância P/dinorfina leva à inibição do GPi e SNr, com consequente ativação do tálamo e do córtex, facilitando o início

do movimento (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN 2015; BOUABID *et al.*, 2016; FAZL; FLEISHER, 2018). Já na via indireta (inibitória), a rede de retransmissão formada pelos núcleos intrínsecos exerce uma influência inibitória tônica no tálamo, que deixa de estimular o córtex motor, inibindo a inicialização do movimento e fechando assim a chamada alça tálamocortical (BOUABID *et al.*, 2016).

As projeções da via dopaminérgica nigroestriatal modulam a atividade das vias direta e indireta (FAZL; FLEISHER, 2018), de forma que a perda significativa (>80%) dos neurônios dopaminérgicos leva à desinibição da via indireta do circuito dos NB, o que se reflete nas manifestações clínicas da DP (movimentos involuntários, redução da força muscular, tendência à inclinação de tronco para frente e ritmo acelerado de marcha) (GALVAN; WICHMANN, 2008; RIZELIO *et al.*, 2010; BERRIOS *et al.*, 2016).

Apesar da DP ser uma patologia estudada há décadas, ainda não se conhece sua etiopatogenia por completo (WEI *et al.*, 2018). Estudos apontam como os principais fatores desencadeantes da morte neuronal dopaminérgica o estresse oxidativo, a excitotoxicidade e a neuroinflamação (KAUR; MEHAN; SIGHN, 2018). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante celular (BISWAS, 2016). As EROs em altas concentrações afetam a homeostase celular, alterando a função de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (BRIEGER *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2018).

Como o estresse oxidativo tem papel de destaque no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas como a DP, doença de Alzheimer (DA), depressão e esquizofrenia (WEI *et al.*, 2018), foram desenvolvidos modelos experimentais para estudo dessas doenças que empregam neurotoxinas, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que causam a produção de EROs e, por conseguinte, levam à degeneração dos neurônios dopaminérgicos (GUO *et al.*, 2018).

A neuroinflamação é caracterizada por respostas das células da glia (microglia e astrócitos) a alterações na homeostase tecidual no SNC (RANSOHOFF *et al.*, 2015; BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2016; NIRANJAN, 2013; KAUR *et al.*, 2017). Evidências mostram que a neuroinflamação ocorre na DP e exerce um efeito deletério sobre os neurônios dopaminérgicos (KAUR *et al.*, 2017), desencadeando uma cascata de eventos que ocasionam a degeneração neuronal (BASSANI; VITAL; RAUH, 2015).

Células microgliais têm importante papel fisiológico no SNC e produzem citocinas anti-inflamatórias, incluindo interleucinas (IL-4, IL-13 e IL-10), glicocorticóides e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (KAUR *et al.*, 2017). Porém, quando ocorre ativação das células microgliais em resposta a estímulo deletério, o efeito é inverso, resultando uma produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator necrótico- α tumoral

(TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12 e outras moléculas citotóxicas para os neurônios (KAUR; MEHAN; SINGH, 2018; CALABRESE *et al.*, 2018).

As células neuronais produzem uma variedade de imunomoduladores, como CX3CL1, CD200, CD22, CD47, CD95 e a molécula de adesão de células neuronais (NCAM), que mantém a resposta microglial quiescente (KAUR *et al.*, 2017; KAUR; MEHAN; SINGH, 2018). A ocorrência dessas interações neurônio-microglia pode ser explicada pelo fato de células da microglia apresentam receptores para tais moléculas (WANG *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, estudos pré-clínicos mostraram que a diminuição de quimiocinas (CX3CL1 ou CX3CR1) resulta em um aumento da neurotoxicidade experimentalmente induzida e morte celular em neurônios dopaminérgicos na SNpc (PABON *et al.*, 2011; WANG; LIU; ZHOU, 2015).

À medida que a DP evolui, a presença de agregados de α -sinucleína, neuromelanina, trifosfato de adenosina (ATP) e metaloproteinase de matriz-3 (MMP-3) aumenta a ativação da microglia, intensificando a neurodegeneração (KAUR *et al.*, 2017).

Os astrócitos também participam do processo neuroinflamatório na DP, sendo estimulados por citocinas pró-inflamatórias liberados da microglia, como IL-1 β e TNF- α (WANG; LIU; ZHOU, 2015; KAUR *et al.*, 2017), observando-se uma resposta que contribui para a morte dos neurônios dopaminérgicos no SNpc (WANG; LIU; ZHOU, 2015).

Em estudos pré-clínicos e clínicos foi observada astrogliose reativa na DP, caracterizada pelo aumento da expressão da proteína fibrilar ácida glial presente em astrócitos (GFAP) e hipertrofia do corpo celular, evidenciando o envolvimento de astrócitos nos processos imunológicos da DP (KAUR; MEHAN; SINGH, 2018). Da mesma forma que as células da microglia, os astrócitos desempenham funções fisiológicas importantes e podem participar de respostas protetoras no SNC, mas uma excessiva reação astrocitária e/ou a perda da função normal dos astrócitos ocasiona maior vulnerabilidade aos neurônios dopaminérgicos e pode estar associada à progressão da DP (MORALES *et al.*, 2016).

3.2 Lesões da via nigroestriatal com 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

No decorrer dos anos, modelos experimentais têm sido uma alternativa acessível para entender a etiopatogenia, os mecanismos fisiopatológicos e as estratégias terapêuticas da DP (CARVALHO *et al.*, 2013). Embora não exista um modelo animal ideal para DP, a aplicação de neurotoxinas tem sido eficiente na reprodução da perda neuronal dopaminérgica (BLESA *et al.*, 2014). A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica sintética, utilizada para provocar a degeneração de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal em modelos *in vivo*, podendo ser utilizada em estudos *in vitro* (GRAMAGE *et al.*, 2022; BLESA; PRZEDBORSKI, 2014). Esta neurotoxina é um análogo hidroxilado do neurotransmissor dopamina (GUBELLINI; KACIDIAN, 2015), que a torna tóxica para os neurônios dopaminérgicos (CHIA; TAN; CHAO, 2020).

A 6-OHDA tem característica química hidrofóbica e não permeia a barreira hematoencefálica. Assim, é classicamente administrada por injeção intracerebral na via nigroestriatal, seja na SNpc (corpos celulares), feixe prosencefálico medial (FPB axônios) ou estriado terminais (ZENG; GENG; JIA, 2018). Após a injeção de 6-OHDA na SNpc ou FPM ocorre uma degeneração massiva de neurônios dopaminérgicos (>90%) em 24h (JAGMAG *et al.*, 2015; GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015), enquanto a lesão no estriado produz uma degeneração retrógrada e progressiva que progride até a 4ª semana (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018).

Os mecanismos responsáveis pela toxicidade e/ou morte celular induzida por 6-OHDA permanecem sob investigação, porém há evidências de que a 6-OHDA promove o processo de degeneração neuronal por causar estresse oxidativo e disfunção da cadeia respiratória mitocondrial (ZENG; GENG; JIA, 2018). Essa neurotoxina acumula-se no citosol onde sofre degradação metabólica e promove a formação de EROs, especialmente o peróxido de hidrogênio, causando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação do DNA e resultando em estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (LE; SAYANA; JANKOVIC, 2014; ZENG; GENG; JIA, 2018).

3.3 Testes Comportamentais

A seleção dos testes para avaliação da atividade motora que são utilizados em modelos experimentais *in vivo* é importante para uma melhor compreensão da etiopatogenia da DP e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, e devem satisfazer aspectos da validade, da confiabilidade e da sensibilidade (BROOKS; DUNNETT, 2009).

3.3.1 Movimentos involuntários anormais

A avaliação dos movimentos involuntários anormais, axiais, de membros, orofaciais e locomotores (MIA) refletem em roedores a presença de LIDs. Os movimentos são reconhecidos como discinéticos quando preenchem os seguintes critérios (i) induzidos através da aplicação de L-DOPA; (ii) o lado contralateral à lesão está afetado e (iii) os movimentos são perceptíveis e sem controle/involuntários (WINKLER *et al.*, 2002).

O teste de MIA é realizado seguindo diretrizes já validadas em diferentes estudos, a saber: (1) discinesia de locomoção, ou seja, locomoção aumentada com viés contralateral à lesão, (2) distonia axial, isto é, postura torácica contralateral do pescoço; (3) discinesia orofacial, ou seja, movimentos estereotipados da mandíbula e protrusão contralateral da língua; (4) discinesia do membro anterior, isto é, movimentos rítmicos repetitivos e/ou postura distônica do membro anterior contralateral à lesão. Para cada subtipo mencionado acima é atribuído um valor de pontuação com grau de severidade variando de 0 a 4 (0 = ausente, 1 = discinesia ocasional exibida por < 50% do tempo observado, 2 = frequente e sustentada

exibida por > 50% do observado tempo, 3 = contínuo, mas interrompido por distrações sensoriais e 4 = discinesia contínua não interrompida por qualquer estímulo externo) (CENCI; LEE; BJÖRKLUND, 1998).

A incidência de movimentos discinéticos pode ser influenciada pela extensão da desnervação dos neurônios dopaminérgicos e pela dose e/ou duração do tratamento com a L-DOPA (WINKLER *et al.*, 2002; LUNDBLAD *et al.*, 2004). Francardo *et al.* (2011) observaram que todos os ratos lesionados no FPM desenvolveram discinesia acentuada, com alternância entre movimentos discinéticos contínuos e atividade normal, enquanto, David *et al.* (2018) demonstraram que aproximadamente 30% dos camundongos lesionados exibiram discinesias axial e orolingual, outros 30% exibiram discinesia locomotora isoladamente e que 40% não apresentaram nenhuma forma de discinesias.

3.3.2 Teste de Comportamento Rotatório

O teste de comportamento rotatório é considerado um padrão robusto e confiável para avaliar a efetividade da lesão no sistema dopaminérgico após a aplicação de 6-OHDA no estriado ou FPM (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018). A gravidade da lesão, quando unilateral, é avaliada através da aplicação de apomorfina, um agonista direto que induz o movimento rotatório contralateral a lesão, através da estimulação dos receptores de dopamina (D1 e D2 pré-sinápticos e pós-sinápticos), que estão expressos em maior número e com maior afinidade devido à privação de dopamina do núcleo estriado. O teste consiste na observação e quantificação das rotações completas de 360° na direção oposta à lesão (contralateral) em torno do próprio eixo (HUH *et al.*, 2019). As lesões no FPM são consideradas efetivas quando se observa ≥ 2 rotações/min (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018), pois só se manifestam quando da perda de células dopaminérgicas > 80% (BECKER *et al.*, 2017; GOES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018; ABOULGHASEMI; JAHROMY; GHASEMI *et al.*, 2019; PADOVAN-NETO *et al.*, 2009).

3.3.3 Teste do Cilindro

O teste do cilindro pode ser usado para estimar a extensão da degeneração dopaminérgica em animais lesionados com 6-OHDA. O teste é realizado mediante uma resposta exploratória típica de roedores para obter uma medida do uso espontâneo e independente do membro anterior do animal após lesões unilaterais. A lesão com 6-OHDA induz uma perda acentuada e lateralizada da função exploratória do membro afetado (BROOKS; DUNNETT, 2009). A avaliação da assimetria do membro anterior é determinada durante a exploração vertical, uma vez que o animal entra em contato com a parede do cilindro e uma contagem é realizada considerando o membro que tocar a parede: contralateral (membro afetado), homolateral (não-afetado) ou ambos (simultaneamente). Os animais são

considerados saudáveis quando a pontuação atinge em média 50% neste teste (BOIX; PADEL; PAUL, 2015; REAL *et al.*, 2017).

Carta *et al.*, (2007) observaram que no teste do cilindro, animais lesionados com 6-OHDA utilizaram apenas 20% de toques com o membro anterior esquerdo alterado, Francardo *et al.* (2011) também observaram que os grupos experimentais com lesões por 6-OHDA mostraram diminuição significativa no uso do membro anterior contralateral à lesão no teste do cilindro. Por sua vez, Liodice *et al.*, (2018) relataram que a porcentagem de uso de pata contralateral em membros anteriores diminuiu significativamente em ratos lesionados com 6-OHDA (29,4%) em comparação com animais controles (48,4%) e que o tratamento com L-DOPA melhorou o desempenho do membro comprometido (um efeito antiparkinsoniano da L-DOPA).

3.4 Tratamento da DP com 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA)

As terapias farmacológicas mais utilizadas para tratamento da DP atenuam os sintomas da doença, mas não impedem a morte celular progressiva. Tais terapias incluem a reposição de dopamina, a inibição de sua degradação e o uso de agonistas dopaminérgicos (STAYTE; VISSEL, 2014; HADDAD *et al.*, 2018). O tratamento da DP com L-DOPA é reconhecido como “padrão ouro”, eficaz na redução dos principais sintomas motores durante a fase inicial da doença, por restaurar em parte os níveis de dopamina no estriado (DEURWAERDÈRE; GIOVANNI; MILLAN *et al.*, 2017; HADDAD *et al.*, 2018).

A reposição de dopamina é realizada com a ingestão do precursor endógeno e metabólico L-DOPA em conjunto com os inibidores da dopa-descarboxilase periférica (carbidopa e/ou benserazida) (PETER, 2014; STANSLEY *et al.*, 2015). Tal combinação é realizada para reduzir os efeitos secundários da medicação, tais como arritmias cardíacas, hipotensão, náuseas e vômitos (devido à conversão de L-DOPA em dopamina fora do SNC) e permitir uma maior disponibilidade de L-DOPA no SNC (DHALL; KREITZMAN, 2016). Estudos indicam que, após administração de L-DOPA por via oral, apenas 1% da dose seja transportada para o SNC de maneira inalterada e que essa baixa disponibilidade no cérebro se dá pela descarboxilação periférica na parede intestinal (metabolismo de primeira passagem) (HOON *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2018).

A dopamina proveniente da L-DOPA é metabolizada na periferia pelo L-aminoácido aromático descarboxilase (ou DOPA descarboxilase - AADC) e pela catecol-O-metiltransferase (COMT), enquanto no encéfalo a dopamina é metabolizada em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) pela enzima monoaminoxidase (MAO) e depois é excretada na urina ou posteriormente convertida pela COMT em ácido homovanílico (HVA), o principal produto da dopamina (CARTA *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2018). Com progressão da DP é necessário o aumento das doses de L-DOPA, e surgem as disfunções como desequilíbrio

(perda de reflexos posturais), congelamento da marcha, movimentos involuntários anormais (denominados de discinesias), flutuações motoras entre o estado "ligado e o "desligado" (*on-off* - oscilações no desempenho de movimentos) (OLANOW, 2014; YOU *et al.*, 2018) e alterações não motoras limitantes, como hipotensão ortostática, sonolência diurna excessiva, alucinações e psicose (FAHN, 2017).

Estudos sugerem que as alterações motoras estejam associadas ao uso prolongado de L-DOPA e sua ingestão contínua por várias vezes ao dia, resultando em uma estimulação pulsátil não fisiológica do receptor de dopamina D₁ no estriado (STANSLEY *et al.*, 2015). As principais complicações motoras, chamadas de discinesias induzidas por L-DOPA (LID), afetam cerca de 49% dos pacientes após 5 anos de início do tratamento (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017). Navailles *et al.* (2010) descreveram que doses altas de L-DOPA aumentam os níveis extracelulares de DA não apenas no corpo estriado, mas em outras regiões do encéfalo que expressam receptores DA, como substância negra, córtex pré-frontal e hipocampo.

Estratégias têm sido propostas para o tratamento de pacientes parkinsonianos acometidos com as LID, como o fracionamento das doses de L-DOPA e/ou alteração nas formulações para uma liberação imediata, intervenções neurocirúrgicas, avaliação detalhada, levando em consideração o tempo e o tipo de discinesia (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017) e ensaios com novas drogas. Assim, entre os medicamentos atuais estão inclusos os agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida, pramipexol); inibidores da MAO-B, como a selegilina; inibidores da COMT (entacapone); antagonistas de receptores glutamatérgicos, a exemplo da amantadina (AMAN) (BIDO; MARTI; MORARI, 2011) e antagonistas colinérgicos (benzotropina) (HADDAD *et al.*, 2018). Um resumo dos tratamentos que são direcionados para restaurar ou substituir a dopamina na DP é descrito no quadro 1.

Quadro 1: Estratégias para o tratamento de DP

Classe de substâncias	Mecanismo	Evidência	Efeitos adversos
Levodopa (com inibidores da Dopa descarboxilase)	Precursor da dopamina	Aumentar os níveis de DA endógena	Flutuações motoras (discinesias)
Agonistas da dopamina	Agonista parcial ou total do receptor de dopamina com afinidade diferente para os subtipos distintos de receptores de dopamina	Aumentar os níveis de DA endógena; Diminuir os sintomas motores nos estágios iniciais da doença	Sedação Transtorno do controle do impulso Sonolência Edema
Inibidores de COMT	Inibição reversível da COMT → menor inativação da levodopa / dopamina	Diminuir o metabolismo da L-DOPA Diminuição da dose diária de L-DOPA necessária	Discinesias Diarreia Toxicidade hepática (tolcapone) Tontura Insônia Náusea
Inibidores da MAO-B	Inibição seletiva de MAO-B → menor metabolização de monoaminas incluindo dopamina	Diminuir o catabolismo de dopamina	Náusea, tontura, dor abdominal, boca seca, sonhos vívidos e / ou alucinações, discinesias, pode melhorar o tremor no início.

Abreviaturas: monoamina oxidase B (MAO-B); catecol-O-metiltransferase (COMT); 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), Stayte; Vissel, 2014; Morgan *et al.*, 2016; Caciatore *et al.*, 2018.

3.5 Discinesias induzidas por L-DOPA

As discinesias são complicações motoras comumente observadas em pacientes com DP e são decorres do uso de L-DOPA, podendo ser classificadas de acordo a concentração plasmática de L-DOPA em relação à evolução temporal. As discinesias de “dose máxima” ou “de pico de dose” geralmente ocorrem durante a maior concentração plasmática de L-DOPA, acompanhadas por um alívio na resposta motora, e são caracterizadas por movimentos involuntários, irregulares, abruptos e rápidos que podem fluir de uma parte para outra do corpo (PERIZ; BORDIA; QUIK, 2018; BARGIOTAS; KONITSIOTIS, 2013) e distônicos (TRAN *et al.*, 2018). As discinesias “bifásicas” coincidem com o aumento (com melhora nos sintomas de parkinsonismo) e posterior diminuição das concentrações plasmáticas de L-DOPA. As discinesias do tipo “período off”, são caracterizadas por uma postura distônica dolorosa, aparecem no início da manhã ou à noite e geralmente ocorrem nas transições dos níveis plasmáticos da levodopa (ambos aumento e redução) (ESPAY *et al.*, 2018; TRAN *et al.*, 2018).

As LIDs podem ser estudadas experimentalmente, com aplicação de toxinas como 6-OHDA e MPTP, que induzem a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (CENCI; CROSSMAN, 2018). Esses estudos mostram que a manifestação de discinesias está associada a modificações na organização dos circuitos dos núcleos da base (Figura 1), particularmente na via direta através dos receptores D₁ e na via indireta com os receptores D₂ (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017; ELKURD; BAHROO; PAHWA, 2018). Cenci e Crossman (2018) relatam que, a depender do grau de neurodegeneração nigroestriatal e o longo tempo de tratamento com L-DOPA, ocorre disfunção do armazenamento e na liberação de dopamina nos terminais pré-sinápticos e alterações nas vias de saída do estriado (pós-sinápticos).

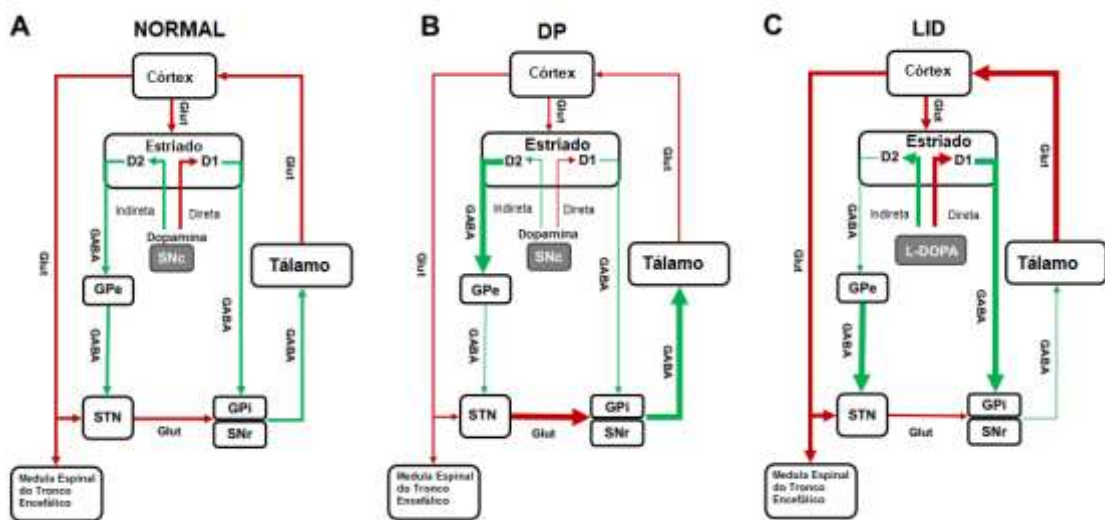


Figura 1: Modelo de circuitos dos núcleos da base representando: (A) condição normal. A entrada de dopamina na substância negra compacta (SNpc) influencia o movimento motor através dos receptores dopaminérgicos D₁ (via direta) e D₂ (via indireta). Basicamente, a estimulação dopaminérgica no receptor D₁ facilita o movimento motor, enquanto a estimulação no

receptor D₂ inibe o movimento motor. (B) doença de Parkinson, a perda de estímulo dopaminérgico da SNpc leva à sub-atividade da via direta e à superatividade da via indireta. (C) doença de Parkinson com LID, após administração prolongada de L-DOPA concomitante com maior grau de perda de dopamina estriatal, as interconexões dentro do circuito nigroestriatal mudam em direções opostas: a hiperatividade da via direta e a subatividade da via indireta produzem atividade motora excessiva (Adaptado: PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017; SHARMA; LYONS; PHAWA, 2018).

Outra provável causa para a ocorrência das LID envolve as rotas de captação e metabolismo da L-DOPA. Em condições fisiológicas, a dopamina é sintetizada no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos pela tirosina hidroxilase (TH), que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA através da oxidação da posição 3 no anel de benzeno. Uma vez produzida, a L-DOPA é convertida em dopamina pela dopa-descarboxilase (AADC) e carregada nas vesículas sinápticas pelo transportador sináptico de monoamina vesicular (TVMA), onde é armazenado e liberada na fenda sináptica mediante estímulos (YOU *et al.*, 2018). A maior parte da dopamina liberada na fenda sináptica é transportada de volta à célula pré-sináptica pelo transportador de dopamina (DAT) (JUÁREZ OLGUÍN *et al.*, 2016; YOU *et al.*, 2018). Quando a L-DOPA é administrada de forma exógena, oralmente, a síntese de DA pode ocorrer em outros neurônios, como os serotoninérgicos, por exemplo. Estes neurônios podem armazenar a DA em vesículas sinápticas, mas não possuem autorreceptores (pré-sinápticos, D₂) e transportadores DAT (Cenci e Lundblad, 2006). Consequentemente, os mecanismos de *feedback* e regulação da síntese e liberação de DA estarão alterados ou ausentes, resultando em alta concentração de DA no corpo estriado e indução da ocorrência de LID (ZHENG *et al.*, 2021).

Outro aspecto a ser considerado são modificações plásticas envolvendo receptores glutamatérgicos (incluindo o tipo N-metil-D-aspartato [NMDA]) no estriado, em neurônios que recebem aferência cortical e que são modulados por DA (PISANU *et al.*, 2018). Estudos têm relatado que níveis elevados de L-DOPA aumentam a ativação dos receptores D₁/D₃ no estriado. A ativação dos receptores de dopamina D₁ resulta numa fosforilação aumentada das subunidades do receptor de glutamato NMDA e, como consequência, ocorre hiperativação das vias de sinalização glutamatérgicas e das vias diretas, de sinalização excitatória (levando a movimentos excessivos ou discinesia) (FREITAS; FOX, 2016; SHARMA; LYONS; PAHWA, 2018).

3.6 Tratamento das LIDs com Amantadina

Além da utilização da levodopa como tratamento para combater a progressão da DP, a amantadina também é muito usada no tratamento dos sintomas motores relacionados a essa patologia. A AMAN foi originalmente descoberta como um agente profilático contra a gripe (influenza A) (DAVIES *et al.*, 1964). Coincidentemente, observou-se um efeito antiparkinsoniano nos pacientes, com melhora nos sintomas da bradicinesia, rigidez e tremor e também foi observado efeito antidiscinético no estado avançado da DP (SCHWAB *et al.*,

1969; SAWADA *et al.*, 2010; SHARMA; LYONS; PHAWA, 2018). Sabe-se que essa droga atua como antagonista não competitivo e de baixa afinidade do receptor NMDA, o que pode explicar seu efeito antidiscinético (BORTOLANZA *et al.*, 2016; BRIGHAM *et al.*, 2018).

Assim, sugere-se que o mecanismo de ação da AMAN esteja relacionado ao aumento na liberação de dopamina e inibição da sua receptação na membrana pré-sináptica e/ou à atuação diretamente nos receptores D₂ (PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018). Evidências sugerem que o bloqueio do receptor de NMDA pela AMAN induz correntes neuronais que podem provocar a estabilização do receptor nicotínico, assim a liberação de acetilcolina dos interneurônios no estriado torna-se reduzida (HOUT *et al.*, 2013).

No entanto o efeito da AMAN pode ser reduzido com o tempo, estudos em modelo *in vivo* demonstraram que AMAN reduz a discinesia LID em doses que variaram de 10 a 60 mg/kg, após aplicação da toxina 6-OHDA. O efeito expressivo foi observado em doses superiores a ≥ 40 mg/kg, enquanto doses abaixo desse valor tiveram efeitos variáveis, conforme apresentado na tabela 1 (BIDO; MARTI; MORARI, 2011); BORTOLANZA *et al.*, 2016). Além disso, efeitos adversos pela administração de AMAN incluem depressão, alucinações e queda da imunidade (OERTEL *et al.*, 2017). Dessa forma, o manejo dos efeitos adversos do tratamento com L-DOPA demanda o desenvolvimento de novas estratégias.

3.7 Própolis vermelha

A própolis vermelha é um conjunto de substâncias químicas provenientes de exsudados de brotos e botões de plantas coletadas por abelhas do gênero *Apis* (*Apis mellifera*). Este produto resinoso sofre uma reação enzimática na saliva das abelhas durante o transporte para a colmeia até serem sintetizadas em própolis. Sua coloração vermelho intensa está ligada à sua origem botânica e propriedades físico-químicas, em geral as amostras de própolis contêm em sua composição 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais e 5% de grãos de pólen (CHEN *et al.*, 2007; RUFFATO, 2017).

A própolis vermelha é classificada como o 13º tipo de própolis, encontrada em diferentes países, a exemplo de Cuba, Venezuela, México e Brasil, cuja origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* (*Clusiaceae*), *Clusia scrobiculata*, *Dalbergia Sp.* e *Dalbergia ecastophyllum*, respectivamente (TRUSHEVA *et al.*, 2006; PICCINELLI *et al.*, 2011; SFORCIN *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014).

No Brasil a própolis vermelha tem sua origem botânica proveniente da *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada nos estados de Alagoas (BARBOSA BEZERRA *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2019), Sergipe (DA SILVA *et al.*, 2015; LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2015, ANDRADE *et al.*, 2017); Bahia (XAVIER *et al.*, 2017), Pernambuco (DAS NEVES *et al.*, 2016; REGUEIRA NETO *et al.*, 2017) e Paraíba (MARTINS *et al.*, 2018).

O uso popular deste produto é crescente e os estudos científicos evidenciaram seus efeitos antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, antioxidante e anti-leishmania (BUENO-SILVA, ALENCAR *et al.*, 2013; BUENO-SILVA, KOO *et al.*, 2013; FREIRES *et al.*, 2016).

Dentre os compostos presentes estão os ácidos fenólicos, os flavonoides, os terpenos, os ácidos aromáticos, os ácidos graxos, os aminoácidos, além de elementos inorgânicos, como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (RIGHI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2104). Tais compostos apresentam concentração variável em função da origem geográfica, sazonalidade, biodiversidade da flora local, técnica de produção (tipo de coletores utilizados na produção) e o gênero e espécie da abelha. Portanto, esse conjunto de fatores possui grande importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas das amostras de própolis (ANDRADE *et al.*, 2017; KUBILIENE *et al.*, 2018).

Como citado anteriormente, estudos têm demonstrado que os extratos de PV possuem propriedades farmacológicas importantes, como antioxidante (FROZZA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2016; XAVIER *et al.*, 2017) e anti-inflamatória (CAVENDISH *et al.*, 2015; BATISTA *et al.*, 2018), que podem ser de particular interesse para doenças neurodegenerativas e desordens neurológicas que têm no estresse oxidativo seu mecanismo subjacente. A potente atividade antioxidante da PV tem sido atribuída à presença de compostos bioativos como vestidol, neovestitol e isoliquiritigenina (OLDONI *et al.*, 2011), e também das isoflavonas formononetina e biochanina A (FROZZA *et al.*, 2013).

3.8 Métodos de extração de própolis vermelha

Os processos de extração mais comuns realizados com a própolis derivam de solventes de alta polaridade, como etanol (FROZZA *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018; REGUEIRA-NETO *et al.*, 2018; RUFATTO *et al.*, 2018). Frente a isto, é frequente a obtenção de compostos de polaridade similar ao solvente utilizado devido ao arraste promovido pela afinidade entre o composto e o solvente.

De acordo com Sena-Lopes *et al.* (2018), a hidrodestilação pelo equipamento de Clevenger é o método de extração mais utilizado para compostos de baixa ou intermediária polaridade. No entanto, este método apresenta um baixo rendimento e requer um maior tempo de processamento. Em relação à obtenção de extratos ricos em compostos químicos de baixa polaridade, David *et al.* (2004) e Aguiar *et al.* (2018) relataram que o método mais comumente utilizado é a maceração com hexano como solvente ou co-solvente de fracionamento. No entanto, este processo é demorado e envolve um maior gasto e exposição do profissional aos solventes orgânicos.

Os processos de extração de compostos químicos alvos de amostras de própolis mais comumente utilizados são a extração por solventes como etanol, água, hexano, acetato de etila e clorofórmio. Contudo, a técnica convencional tem algumas desvantagens, incluindo forte valor residual, possíveis reações adversas, prejudiciais ao meio ambiente, baixa qualidade do extrato e longo processo requisito de período.

Em decorrência deste entrave, busca-se um método que potencialize e otimize o processo de extração e obtenção de compostos bioativos, permitindo maior seletividade, menor gasto com solvente, extração rápida e, conseqüentemente, diminuição da exposição do profissional e a contaminação ambiental. Entre os métodos de extração mais promissores, destaca-se a extração por líquidos pressurizados (PLE), este processo utiliza uma técnica avançada de extração de compostos fenólicos que apresenta vantagens em relação às extrações convencionais. A PLE permite a realização de uma extração rápida dos analitos em um ambiente inerte sob alta pressão

e temperatura as quais influenciam na eficiência do processo, garantindo maior seletividade dos substratos obtido, utilizando solventes orgânicos, o que permite a solubilização eficiente dos compostos bioativos presentes na amostra. Além disso, a pressão aplicada durante a extração aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos e reduz a necessidade de longos tempos de extração (IDRUS *et al.*, 2018).

Entre os modelos de extração que utilizam a alta pressão, destaca-se a extração acelerada com solvente (ASE™), é um método que utiliza a alta pressão em ambiente fechado totalmente automatizado, possibilitando a determinação de variáveis como tempo, temperatura, quantidade de ciclos, pressão e solventes, permitindo extrações rápidas, podendo utilizar múltiplos solventes em menores quantidades garantindo a denominada tecnologia verde atribuída ao método (ANNUNCIAÇÃO *et al.*, 2018). Atualmente diversos estudos relacionados aos processos de obtenção de compostos bioativos fazem uso do ASE™, este recurso promissor promove o maior desempenho para desenvolvimento ou otimização de modelos de extração de compostos químicos (ANNUNCIAÇÃO *et al.*, 2018; RAMIREZ-CADAVID *et al.*, 2018; AGUIAR *et al.*, 2018).

No estudo realizado por He *et al.*, (2018), foi possível avaliar a atividade antioxidante e o valor de compostos fenólicos totais de extratos de goji black berry obtidas a partir da extração acelerada com solvente, neste processo as variáveis como tempo (3 e 13 minutos) e temperatura (50 e 100 °C) foram aplicadas ao equipamento, com solvente, pressão e número de ciclos constantes. Os resultados obtidos mostraram que o método de extração influenciou significativamente na obtenção de amostras concentradas de compostos fenólicos, o que conseqüentemente influenciou na elevada atividade antioxidante relatada.

Comparativamente, as extrações convencionais, como a extração com solvente único ou a extração com solvente misto, apresentam desvantagens, como a baixa eficiência de extração e a necessidade de grandes volumes de solventes. Portanto, a extração por líquidos pressurizados é uma técnica eficiente e sustentável para a extração de compostos fenólicos, que permite a obtenção de maiores rendimentos de extratos fenólicos em menor tempo e com menor consumo de solventes (MIRON *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013).

3.9 Caracterização Química de Extratos

A caracterização química de extratos é essencial para determinar a composição química e as propriedades físico-químicas dos compostos presentes em uma amostra. Entre os métodos mais utilizados para essa caracterização, estão a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectroscopia no infravermelho com transformada

de Fourier (FTIR), a termogravimetria (TG) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), como será descrito abaixo.

3.9.2 Cromatografia líquida de alta performance

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica amplamente utilizada na análise de compostos orgânicos presentes em extratos naturais. A utilização do HPLC para identificar compostos fenólicos em compostos orgânicos tem sido amplamente empregada devido a sua eficiência de separação dos compostos, proporcionando uma análise mais precisa e acurada, além da alta sensibilidade de detecção de compostos em baixas concentrações.

Um estudo realizado por Nagy *et al.* (2018) demonstrou a eficácia da utilização do HPLC na identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes em extratos de plantas. Neste trabalho, os autores utilizaram uma coluna cromatográfica C18 e um gradiente de solventes composto por água e acetonitrila. Os resultados mostraram que o método de HPLC foi capaz de identificar e quantificar com precisão os compostos fenólicos presentes nos extratos de plantas.

Outro benefício do HPLC é a capacidade de separar os compostos fenólicos em diferentes classes, como flavonoides, ácidos fenólicos e suas respectivas agliconas. Em um estudo realizado por Pérez-Martínez *et al.* (2020), foi desenvolvido um método de HPLC para separar e quantificar diferentes classes de compostos fenólicos presentes em extratos de plantas. Neste estudo, os autores utilizaram uma coluna cromatográfica C18 e um gradiente de solventes composto por água e acetonitrila contendo ácido fórmico. Os resultados mostraram que o método de HPLC foi capaz de separar com precisão diferentes classes de compostos fenólicos, permitindo uma análise mais completa e detalhada desses compostos.

O extrato de própolis vermelha é conhecido por conter uma ampla variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e suas respectivas agliconas, além de ácidos graxos, esteroides e terpenoides. A separação desses compostos é realizada utilizando-se uma coluna cromatográfica, que é empacotada com uma fase estacionária que interage seletivamente com os compostos presentes na amostra. A separação é obtida pela eluição dos compostos da coluna com um solvente móvel, cuja composição é gradualmente modificada ao longo do tempo. Análise de extrato de própolis vermelha, a técnica de HPLC é frequentemente empregada para separar e identificar os compostos bioativos presentes nesta matriz.

Diversos trabalhos recentes têm empregado a técnica de HPLC para analisar os compostos presentes em extratos de própolis vermelha. Em um estudo realizado por

Wu *et al.* (2018), foi desenvolvido um método de HPLC para identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em extratos de própolis vermelha produzidos na China. Neste estudo, os autores utilizaram uma coluna cromatográfica C18 e um gradiente de solventes composto por água e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. Através deste método, os autores identificaram vinte e dois compostos fenólicos diferentes, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e suas respectivas agliconas.

Em outro estudo, realizado por Búfalo *et al.* (2020), foi avaliada a atividade anti-inflamatória de extratos de própolis vermelha produzidos no Brasil. Neste trabalho, os autores utilizaram a técnica de HPLC para identificar e quantificar os compostos bioativos presentes nos extratos de própolis. Os resultados mostraram que o extrato de própolis vermelha apresentou uma alta concentração de ácido cafeico e seus derivados, além de compostos fenólicos como quercetina, apigenina e kaempferol.

3.9.3 Termogravimetria

A termogravimetria (TG) é uma técnica analítica amplamente utilizada para caracterização térmica de materiais. A metodologia da TG envolve a medição da massa de um material em função da temperatura ou tempo, enquanto ele é submetido a um programa de aquecimento ou resfriamento controlado.

Segundo Anjum *et al.* (2021), a técnica de TG é particularmente útil para a análise de polímeros, permitindo a determinação de suas propriedades térmicas, como ponto de fusão, degradação térmica e transições de fase. Além disso, a TG também é empregada na avaliação da estabilidade térmica de medicamentos e produtos farmacêuticos, conforme destaca Zhao *et al.* (2019).

A análise termogravimétrica é baseada na detecção de mudanças na massa de uma amostra durante a sua decomposição térmica, que ocorre devido à quebra de ligações químicas. Esta técnica fornece informações valiosas sobre a estabilidade térmica de materiais e pode ser utilizada para avaliar a qualidade de produtos químicos, bem como a eficácia de processos de síntese ou modificação de materiais.

3.10 Propriedades biológicas

Os extratos da própolis têm apresentado diversas atividades farmacológicas, como propriedades hipotensoras (Mahmoud *et al.*, 2019), imunomoduladoras (NASSAR *et al.*, 2012), antitumorais (FRION *et al.*, 2019), antibacterianas (El-Guendouz *et al.*, 2019), antivirais (Hochheim *et al.*, 2019), antifúngicas (Djais *et al.*, 2019), anti-inflamatórias (Y *et al.*, 2019), que são atribuídas à sua complexa composição química, principalmente pela presença de fotoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas.

Os flavonoides são amplamente reconhecidos como os principais compostos bioativos presentes na própolis, responsáveis pelos seus efeitos benéficos à saúde. Esses compostos fenólicos, originários de plantas, possuem múltiplas atividades fisiológicas, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Além disso, as benzofenonas, outro tipo de composto fenólico com alta atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, também foram identificadas e isoladas a partir de própolis, especialmente aquelas provenientes de regiões tropicais (Borges *et al.*, 2018; Yeabyo *et al.*, 2018)

As características biológicas da própolis podem ser correlacionadas a um espectro de compostos químicos presentes na sua resina. A composição química e as propriedades biológicas da própolis são susceptíveis a variações, em função da técnica empregada para a sua extração (Sena-Lopes *et al.*, 2018).

3.11 Formononetina

A formononetina é um dos componentes em maior quantidade na PVB, mas também é encontrada em leguminosas (JIANG *et al.*, 2019) e em muitas ervas como *Trifolium pratense* L., *Spatholobus suberectus* Dunn. e *Astragalus mongholicus* Bunge (TIAN *et al.*, 2022). Estudos mostram que a FN apresenta atividade antimicrobiana (NEVES *et al.*, 2016), bactericida (SIQUEIRA *et al.*, 2014), antiapoptótica (WANG *et al.*, 2012), vasodilatadora (WU *et al.*, 2010), citotóxica (FREIRES *et al.*, 2016), antiaterogênica, cicatrizante, regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (MACHADO *et al.*, 2021; SIQUEIRA *et al.*, 2014), anti-inflamatória e antinociceptiva (CAVENDISH *et al.*, 2015) e neuroprotetora (LI *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2022)

Cavendish *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da administração oral da formononetina (10 mg/kg) em um modelo de dor induzida quimicamente e sobre a resposta inflamatória. Foram realizados os testes de constrição abdominal induzida por ácido acético, de lambida da pata induzida por formalina e de nocicepção induzida por glutamato, campo aberto para avaliar o comportamento motor e emocional; para induzir a inflamação foi utilizada a carragenina. Os autores observaram que tanto o extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) quanto a formononetina apresentaram ação anti-inflamatória, que pode ser devido sua capacidade de interagir com mediadores inflamatórios ou por suas propriedades antioxidantes.

Wang *et al.* (2012) avaliaram os efeitos *in vitro* da FN na apoptose celular induzida por IL-1 β em células de linhagem insulinoma de rato (INS-1), encontraram que a FN previne a morte celular e inibe a atividade da Bax/Bcl-2 e inibe a atividade da caspase-3, assim a FN mostra-se capaz de proteger as células β pancreáticas da apoptose

causada por IL-1 β e bloqueia citocinas sinalizadoras da apoptose e também inibiu a ativação do fator nuclear kappa (NF-kB), o que a torna promissora no tratamento da diabetes mellitus.

Muitos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* têm verificado o efeito protetor da FN frente à neurodegeneração e lesões traumáticas do SN. Tian *et al.* (2022) estudaram o efeito neuroprotetor da FN contra a apoptose induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios corticais. O NMDA produziu perda neuronal na cultura celular, no entanto quando foi feito o pré-tratamento com a FN, observou-se aumento da viabilidade celular e diminuição de apoptose por regulação negativa da relação Bax/Bcl-2 e inibição da ativação da pró-caspase-3.

Li *et al.* (2017) avaliaram os benefícios da FN na lesão traumática cerebral (TBI). Os resultados mostram que o grupo tratado com FN apresentou melhora das alterações causadas pela lesão (inconsciência e transe), com diminuição do edema e de necrose nas áreas lesionadas e aumento do número de células nervosas, em comparação com o grupo lesão sem tratamento. O tratamento com FN também proporcionou aumento dos níveis de enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), e diminuição nos níveis de malondialdeído (MDA), que é produzido pela degradação de lipídeos poli-insaturados mediado, e de TNF- α e IL-6. Os autores concluíram que a FN promoveu neuroproteção através da redução da inflamação e por melhorar a capacidade antioxidante do cérebro.

Liang *et al.* (2014) buscaram avaliar os mecanismos pelos quais a FN atua na neuroproteção frente à lesão cerebral isquêmica (modelo de isquemia/reperfusão). Para isso, a artéria cerebral média direita foi ocluída durante 2 horas e passou por um período de reperfusão de 24 horas. Observou-se que houve redução do edema cerebral e da área isquêmica, com melhora do déficit neurológico, e diminuição de apoptose (relação Bax/Bcl-2), resultando em neuroproteção. Sun *et al.* (2012) mostraram que a FN protege neurônios contra a citotoxicidade induzida por hipóxia utilizando um modelo *in vitro* para estudo da doença de Alzheimer (linhagem de células N2a- A β PP); o tratamento com FN promoveu diminuição da expressão da caspase-3, pelo mecanismo de estímulo à clivagem da proteína precursora beta amiloide (A β PP).

Ainda, foi observada a atividade neuroprotetora de um EHPV rico em formononetina (BARBOSA *et al.*, 2015). Os autores utilizaram um modelo de esmagamento do nervo ciático em ratos. Os animais receberam tratamento (via oral) com veículo (Tween 80 a 2% em solução salina), EHPV 1 mg/kg, EHPV 10 mg/kg e Ibuprofeno 60 mg/kg, o grupo sham recebeu apenas veículo, todos durante 28 dias, uma vez ao dia. Para avaliar a reabilitação funcional foi utilizado o IFC, e o teste de Basso, Beattie and Bresnahan (BBB), também foi realizado o teste de reflexo de retirada. Todas

as avaliações foram realizadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 após a lesão. A composição química da amostra de EHPV foi avaliada por meio da espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) utilizada neste estudo, que apresentou pinocembrina, formononetina, vestitol e biochanina A. Os resultados mostram que o EHPV, tendo a formononetina como composto em maior concentração, promoveu a recuperação funcional, aumento da mielinização e preservação da área do nervo após axonotmese do nervo ciático em ratos.

3.12 Biochanina A

A biochanina A é uma isoflavona presente em diversos produtos naturais, como são trevo vermelho, alfafa, soja e própolis vermelha. Esse composto apresenta atividades biológicas antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e anticancerígena. Além disso, estudos recentes mostram que a biochanina A também apresenta efeitos no sistema nervoso central (FENG; LAI, 2023).

Um estudo recente mostrou que a biochanina A presente na própolis vermelha tem atividade antioxidante significativa, o que pode ter implicações para a saúde humana. A atividade antioxidante da biochanina A foi avaliada em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, mostrando resultados promissores (Shi *et al.*, 2020). Além disso, outro estudo relatou a capacidade da biochanina de inibir a proliferação de células cancerígenas, sugerindo seu potencial como um agente terapêutico no tratamento do câncer (Huang *et al.*, 2019).

Há vários relatos da ação neuroprotetora da biochanina A. por exemplo, essa isoflavona promoveu neuroproteção contra lesão isquêmica/reperfusão cerebral por inibição do estresse oxidativo mediada por Nrf2. Além disso, melhorou as atividades de SOD e GSH-Px e suprimiu a produção de MDA, e inibiu a ativação de NF-kappaB (GUO *et al.*, 2019). Ainda no tocante a marcadores neuroinflamatórios e EROs, a biochanina A protegeu neurônios dopaminérgicos da toxicidade induzida por lipopolissacarídeo *in vivo* e *in vitro*, com diminuição da resposta microglial e dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (WANG *et al.*, 2016). Em modelo experimental para estudo da DP utilizando rotenona (pesticida tóxico), o tratamento de camundongos com a biochanina A melhorou o desempenho motor e promoveu neuroproteção; os mecanismos pelos quais a biochanina A produziu tais efeitos incluíram aumento de defesas antioxidantes (glutathione, malondialdeído), diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação aumentada de proteínas da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e diminuição na expressão de GFAP (EL-SHERBEENY *et al.*, 2020)

Pesquisas indicam que a biochanina A pode modular a neurotransmissão e ter efeitos ansiolíticos e antidepressivos (ZADA et al., 2022; DIKSHA, BHATIA., 2024). Um estudo em ratos mostrou que a administração de biochanina A reduziu a ansiedade em testes comportamentais e aumentou a atividade de receptores GABA no cérebro (DIKSHA, BHATIA., 2024).

No entanto, é importante destacar que os efeitos da biochanina na saúde humana ainda não são completamente compreendidos e mais pesquisas são necessárias para avaliar seus efeitos potenciais. Um estudo recente avaliou os efeitos da biochanina sobre a microbiota intestinal em ratos e mostrou que a exposição a essa isoflavona pode ter efeitos negativos sobre a composição da microbiota intestinal, o que pode afetar a saúde intestinal e geral (Zhang *et al.*, 2019). Portanto, é importante considerar os possíveis efeitos negativos da biochanina antes de sua aplicação em terapias.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção da própolis vermelha

A própolis vermelha foi obtida do apiário Santo Antônio localizado no município de Barra de Santo Antônio, Alagoas, Brasil (coordenadas 09° 24' 17" S 35° 30' 26"), no mês de agosto de 2017.

4.2 Preparo da amostra de própolis vermelha

A própolis vermelha foi congelada em temperatura abaixo de -100 °C, em seguida a amostra congelada foi triturada por moinho de 4 facas e separadas frações de 18 a 32 mesh. Em seguida, a amostra foi armazenada em recipiente de vidro e refrigerado de 2 a 8 °C em geladeira.

4.3 Extração de PV por líquidos pressurizados

A extração foi realizada utilizando o modelo de extração adaptada em Jesus *et al* (2013), para extração foi composta por uma unidade de extração utilizando reservatórios de solvente; dois banhos termostáticos; uma bomba de HPLC (Syringe Pump ISCO 500 D) e uma bomba de deslocamento positivo (HPLC Pump, Series III); um extrator de aço inox com capacidade de 157,3 cm³; 2,0 cm de diâmetro e 25,0 cm de altura; uma válvula micrométrica HIP; uma fita térmica e frasco coletor (Figura 2). Este equipamento em sua estrutura tem capacidade de atuar utilizando gases pressurizados, líquidos pressurizados ou mistura de ambos simultaneamente. Quando operando com etanol, o solvente foi disposto numa proveta para alimentar a bomba isocrática de fluxo positivo (New Alliance SÉRIE III) por um tubo flexível de Peek tubing com diâmetro externo de 1/16 polegadas. As tubulações oriundas de ambas as bombas foram interligadas por um "T" em aço inox de marca swagelock, direcionando os solventes para o extrator. A unidade foi montada com total flexibilidade para trabalhar com apenas um tipo de solvente líquido (Etanol), ou com mistura de solventes. O tempo de extração foi de uma 1 hora e 30 min, onde a amostra passava 1 hora para estabilização de temperatura no banho termostático e uma boa dispersão térmica na amostra.

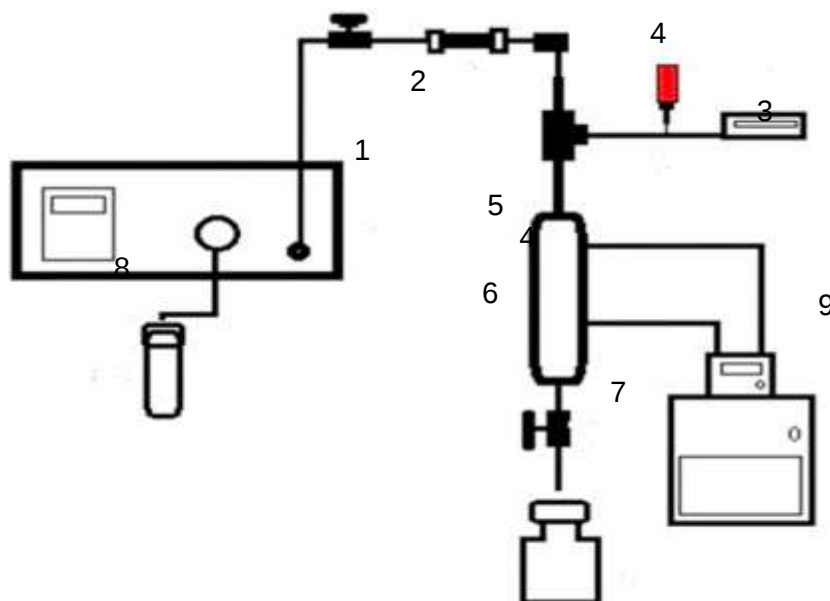


Figura 2: Aparato experimental para extração de líquido pressurizado: (1) bomba isocrática de fluxo positivo; (2) Válvulas de retenção; (3) Indicador de pressão; (4) Transdutor de pressão; (5) Extrator; (6) Válvula de agulha; (7) Coletor de amostras; (8) Reservatório de solvente líquido; (9) Banho termostático.

4.4 Cromatografia líquida de alta performance

A análise por HPLC foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida pelo grupo seguida por Santos *et al.* 2017. Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-20AT, com detector UV-vis) e uma coluna analítica Phenomenex 5 μ EVO C18 100Å; C18 150 x 4,6mm. A fase móvel de eluição foi composta por Metanol grau HPLC + 0,1% de ácido fórmico (B) e água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico (A), gradientes e análise (Quadro 2). A taxa de fluxo isocrático foi de 1,0 mL/min por 30 min e o comprimento de onda de detecção foi feito em 270 nm, 280 nm e 290 nm. Todas as corridas foram realizadas em temperatura constante de 30 °C. Para o volume de injeção foi de 20 μ L das amostras de soluções contendo extratos brutos. O tempo de retenção dos compostos analisados foi de Biochanin-A: 20,5 e Formononetina: 18,2. A identificação da Formononetina e Biochanina-A no extrato hidro etanólico de própolis vermelha foi utilizado nos padrões Biochanin-A e Formononetina (Sigma Aldrich, grau HPLC).

Quadro 2: Gradientes utilizados na amostra do extrato.

Tempo (min)	A (%)	B(%)
0:00	80	20
10:00	60	40
15:00	50	50
20:00	35	65
25:00	20	80
27:00	80	20
30:00	80	20

4.5 Termogravimetria (TGA)

Para verificação da perda de massa do material obtido em função de uma programação controlada de temperatura foi realizada análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG). Foram analisadas extrato hidro etanólico de própolis vermelha em diferentes condições de temperatura durante a extração, EPV a -30 °C, EPV a -20 °C, EPV a -10 °C, EPV a 0 °C, EPV a 10 °C, EPV a 20 °C e EPV a 30 °C. As condições experimentais foram: faixa de temperatura de 25 a 550; nitrogênio com vazão de 50 mL/min, cadinho de platina com 2,5 mg de amostra (CARUCCI *et al.*, 2021).

4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia do extrato etanólico de própolis vermelha foi observado por microscopia eletrônica de varredura, usando um microscópio eletrônico (modelo ASPEX). As amostras foram colocadas na superfície de uma fita dupla face e revestidas com uma fina camada de ouro e sobrepostas em fita de carbono sob o suporte metálico com uma tensão de 15 KV. Antes das análises, as amostras foram mantidas em uma temperatura de 100 °C como pré-teste durante 12 horas (OLIVEIRA, e al. 2019).

4.7 Ensaio *in vivo*

4.7.1 Aspectos éticos

Para o desenvolvimento deste projeto foram respeitados os princípios éticos da experimentação animal, de acordo com a Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as normas para a prática didático-científica de acordo com a Lei nº 11.794/2008, e resolução normativa nº 53 de 19 de maio de 2021, que dispõe sobre o uso de animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA), aprovado com o parecer de número 020518 (Anexo 1).

4.7.2 Obtenção da formulação contendo formononetina

A FN foi adquirida através da empresa Xi'na Olin Biological Technology CO LTD, devido seu grau de pureza de 98.02 % e foi suspensa em uma formulação descrita no quadro 3.

Quadro 3: Formulação contendo FN.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
Formononetina	0,4	Ativador
Benzoato de sódio	02	Conservante
Goma Xantana	0,1	Agente suspensor
Ácido cítrico	0,1	Ajuste de pH
Sorbitol	q.s.p 100	Veículo

4.7.3 Desenho experimental e formação dos grupos

A figura 3 ilustra esquematicamente o decurso temporal dos experimentos. Os animais foram pesados um dia antes das cirurgias e submetidos a uma avaliação pré-operatória com objetivo de excluir animais com déficits motores. Foi realizada cirurgia estereotóxica para aplicação da toxina monoaminérgica 6-OHDA (ou solução salina contendo ácido ascórbico) no feixe prosencefálico medial. Decorridos 21 dias após os procedimentos cirúrgicos e após aferição da efetividade da lesão (por meio do teste de comportamento rotatório), os roedores receberam tratamento salina ou com L-DOPA (25 mg/kg + benserazida 10 mg/kg, diluído em salina 0,9%, v.o, 1 mL), concomitante ao tratamento com FN (60 mg/kg, v.o.) ou veículo (formulação sem FN), duas vezes ao dia por outros 21 dias (SANTOS PEREIRA, 2016), durante os quais foram avaliados os movimentos involuntários anormais (MIA - discinesias, dias 1 e 21 de tratamento) e a função motora (teste do cilindro, 21 dias de tratamento). A eutanásia foi realizada no dia seguinte ao último teste comportamental, para retirada dos encéfalos e processamento para análise imunohistoquímica. Os animais foram divididos, portanto, em 4 grupos (n = 5/grupo), como descrito no quadro 4.

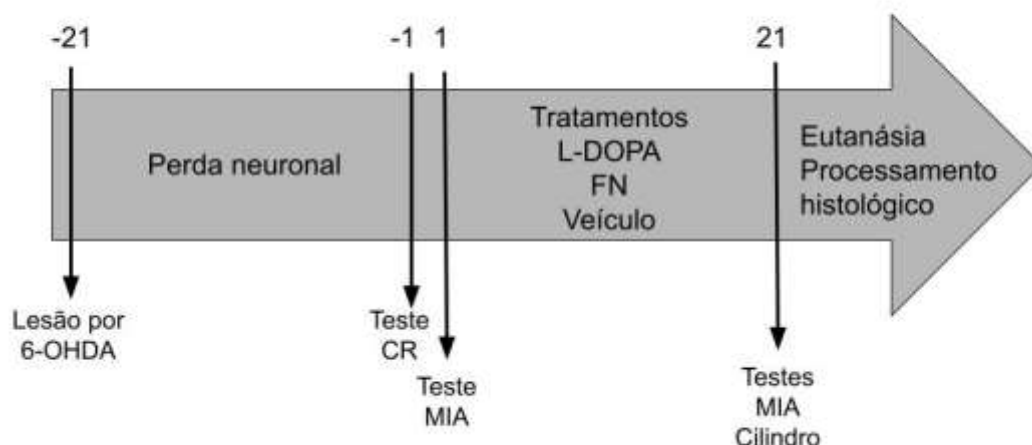


Figura 3: Representação esquemática do desenho experimental ao longo do tempo (-21 a 21 dias). 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; CR: teste de comportamento rotatório; L-DOPA: 3,4-di-hidroxifenilalanina; FN: formononetina; MIA: movimentos involuntários anormais.

Quadro 4: Esquema de distribuição dos grupos experimentais.

Grupos (n = 5)	Aplicação intracerebral	Indução das discinesias	Tratamento
Sham	Veículo (salina com ácido ascórbico 0,005%)	Salina	Veículo (formulação sem FN), v.o
6-OHDA/VC	6-OHDA	Salina	Veículo (formulação sem FN), v.o
L-DOPA/VC	6-OHDA	L-DOPA	Veículo (formulação sem FN), v.o
L-DOPA/FN	6-OHDA	L-DOPA	Formulação contendo FN 60 mg/kg, v.o

6-OHDA: 6-hidroxidopamina; FN: formononetina; L-DOPA: 3,4-di-hidroxifenilalanina.

4.7.4 Procedimentos cirúrgicos: estereotaxia

A cirurgia estereotáxica foi realizada com os ratos anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (75 mg/kg), administrados por via intraperitoneal (i.p) (GOMES *et al.*, 2003; PADOVAN-NETO *et al.*, 2009; BORTOLANZA *et al.*, 2015). Após anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça e a perfuração da calota óssea com broca odontológica para inserção da micro agulha. Foi realizada uma única injeção de 6-OHDA (16 µg em 3 µL de salina a 0,9% contendo 0,05% de ácido ascórbico) ou veículo na região do feixe prosencéfalo medial (MFB) esquerdo nas

seguintes coordenadas (em mm, PAXINOS, WATSON, 1998): anteroposterior (AP): -4,4 em relação ao Bregma; lateral (L): +1,2 em relação à linha média; dorsoventral (DV): -8,2 a partir do crânio. As soluções foram infundidas à velocidade de 1 µL/min e a cânula permaneceu no local por 3 min antes da retirada a fim de evitar o refluxo (BORTOLANZA *et al.*, 2015). Ao término da cirurgia, foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal LTDA, 0,5 mL) e, para recuperação da anestesia, os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W. Os ratos receberam cuidado intensivo durante o período de tratamento para reduzir a perda de peso, evitar o sofrimento e aumentar as taxas de sobrevivência: Duas vezes por dia, os animais receberam terapia de reidratação (até um 1 mL de dextrose a 5%, administrado por via subcutânea) e dieta com multicereais (SANZ-BLASCO *et al.*, 2017).

4.7.5 Avaliação comportamental

4.7.5.1 Teste de comportamento rotatório (CR)

O comportamento de rotação foi medido após aplicação do agonista dopaminérgico cloridrato de apomorfina, administrado por via subcutânea (0,5 mg/kg), com os animais alocados em um cilindro (20 cm de diâmetro e 40 cm de altura). Os animais foram aclimatados ao ambiente durante 5 min antes do teste. O teste de comportamento rotatório consiste em quantificar o número de voltas completas durante 45 min, além de observar o sentido dos giros realizados pelos animais ao redor do próprio eixo (contralateral ou homolateral à lesão). Por ser um teste que permite avaliar a efetividade da lesão da via dopaminérgica nigroestriatal, apenas ratos apresentando > 2 voltas/min (> 90 voltas/45 min) foram incluídos no estudo (PADOVAN-NETO *et al.*, 2011; DOS-SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2016) e então deu-se início aos tratamentos. Os testes sempre foram realizados entre as 14:00h às 18:00 h.

4.7.5.2 Teste de movimentos involuntários anormais (MIA)

Os movimentos involuntários anormais do tipo axiais, de membros, orofaciais e locomotores (MIA) foram avaliados de acordo com uma escala de discinesias de ratos validada (CENCI *et al.*, 1998; WINKLER *et al.*, 2002). As avaliações foram realizadas no 1º e 21º dia de tratamentos com L-DOPA, concomitante à administração de FN ou veículo. As pontuações foram atribuídas como (0) ausentes; (1) presente por menos da metade do tempo de observação; (2) presente por mais da metade do tempo de observação; (3) contínuo, mas interrompido por fortes estímulos sensoriais; (4) contínuo, não interrompido por fortes estímulos sensoriais. A observação foi realizada a

cada 20 min durante 1 min e então obteve-se a soma para cada animal até a duração total de 3h após a administração de L-DOPA (PADOVAN-NETO *et al.*, 2009; PADOVAN-NETO *et al.*, 2015). Os escores axial, de membros e orofacial foram somados e analisados como um único item (global), enquanto os escores da locomoção foram analisados como um item separado (LUNDBLAD *et al.*, 2002). Somente ratos que apresentaram graus de gravidade ≥ 2 em pelo menos um dos subtipos de MIA foram incluídos no estudo (PADOVAN-NETO *et al.*, 2013).

4.7.5.3 Teste do cilindro

A assimetria dos membros anteriores (função motora) foi determinada durante o comportamento de exploração vertical do animal (CENCI, LUNDBLAD 2007). Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de vidro (16 cm de diâmetro e 30 cm de altura) que permitiu a sua observação em 360° e foram filmados imediatamente por 5 min. O número de toques na parede (contatos com dígitos totalmente estendidos) executado com os membros superiores homolateral e contralateral foram mensurados, conforme a equação (BOIX; PATEL; PAUL, 2015):

$$\% Pt = \frac{T_c}{T_h + T_c} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Equação para medida da porcentagem dos toques contralaterais à lesão por 6-OHDA. % Pt = Porcentagem de toques, Tc = Toques contralaterais (direito), Th = Toques homolateral (esquerdo).

4.7.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por sobredosagem de anestesia (cloridrato de cetamina a 300 mg/kg e cloridrato de xilazina a 30 mg/kg, por via intraperitoneal.), sendo removidos os encéfalos, que foram desidratados em série de alcoólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos foram então levados ao micrótomo, para fornecer os cortes de 5 μ m. Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar em água aquecida e então colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas, levadas para estufa. Foram obtidas secções nas seguintes regiões cerebrais, identificados com o auxílio do Atlas de PAXINOS; WATSON (1998): substância negra compacta (mesencéfalo) e núcleo estriado dorsal (caudado/putâmen - telencéfalo).

4.7.7 Avaliação imunohistoquímica

Foram investigadas a expressão da enzima tirosina-hidroxilase (TH, enzima limitante da síntese de dopamina e marcador de neurônios dopaminérgicos) e da

proteína glial ácido fibrilar presente em astrócitos (GFAP). As lâminas com cortes encefálicos passaram pelo processo de desparafinização e desidratação e então foi realizado enxágue das secções com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,0). Foi realizada a recuperação antigênica utilizando *steamer*, em tampão citrato de pH 6,0 (3 ciclos de 5 min). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (H_2O_2 - 1%), bloqueio por incubação com soro albumina-bovina 5%, (BSA, Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) e incubação com anticorpo primário dirigido contra os antígenos de interesse: (1) anti-TH policlonal produzido em camundongos, na diluição 1:500, clone TH-16, lote n° T2928, Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA e (2) anti-GFAP monoclonal, produzido em camundongos, clone S206A-8, 1:100, lote SAB5201104; Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA). Após nova lavagem, as secções foram incubadas com anticorpo secundário (DAKO LSAB2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA), conjugado com complexo streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA), na ordem Biotinilado por 30 min, seguido por Estreptidina por mais 30 min. Para revelação, as secções foram incubadas com o tetracloreto de 3'3'- diaminobenzidina (kit DAB, Vector Laboratories) diluído em tampão tris (Tris-buffered saline) (TBS) pH 7,4) com peróxido de hidrogênio (0,3%) e lavadas em água destilada. As lâminas foram desidratadas e diafinizadas. Por fim, as lamínulas foram fixadas com bálsamo do Canadá sobre as lâminas. Foi realizada contracoloração com hematoxilina de Harris por 3min nas lâminas destinadas à análise da imunomarcacão para GFAP (VIVANCO-ESTELA et al., 2021).

4.7.8 Análises de imagens

As imagens fotografadas nas regiões dos núcleos da base (núcleo estriado - caudado/ putâmen - e substância negra compacta) foram capturadas usando microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. O campo visualizado foi registrado (salvo). Depois de ajustada pelo sistema de edição, a imagem foi transferida para o microcomputador e a seguir analisada (contagem de células positivamente marcadas) pelo software "*Image J*" do National Institute of Health (NIH, W. Rasband, domínio público National Institute of Mental Health). As secções escolhidas para análise das estruturas foram previamente selecionadas, sempre ao mesmo plano ântero-posterior das figuras do Atlas de PAXINOS; WATSON (1998).

Para a quantificação de células TH (substância negra compacta) e GFAP (núcleo estriado) imunorreativas, foram selecionadas lâminas com 3 ± 1 secções contendo as áreas de interesse. Foram feitas imagens de todas as secções contidas nas lâminas, com ampliação de 100x, e todo o campo foi analisado (PADOVAN-NETO et al., 2015).

4.7.9 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição Gaussiana. As amostras atenderam ao pressuposto de normalidade e foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey (histologia, teste do cilindro) ou de duas vias com medidas repetidas (MIA), com pós-teste de Bonferroni. Embora o teste de MIA forneça dados na forma de escores, foi realizada estatística paramétrica pois as pontuações correspondem à extensão do tempo em que o comportamento se manifesta (dados contínuos). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 8.0, San Diego, USA*. Os dados foram apresentados com média $\pm$ EPM e as diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. A dieta teve início uma semana antes da cirurgia para adaptação dos animais ao sabor deste suplemento alimentar para reforçar o peso e a sua condição física.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do extrato de própolis vermelha

5.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O extrato de própolis vermelha é conhecido por conter uma ampla variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e suas respectivas anglicanas, além de ácidos graxos, esteroides e terpenos. A separação desses compostos é realizada utilizando-se uma coluna cromatográfica, que é empacotada com uma fase estacionária que interage seletivamente com os compostos presentes na amostra. A separação é obtida pela eluição dos compostos da coluna com um solvente móvel, cuja composição é gradualmente modificada ao longo do tempo. Análise de extrato de própolis vermelha, a técnica de HPLC é frequentemente empregada para separar e identificar os compostos bioativos presentes nesta matriz.

A análise HPLC deste estudo podemos detectar a presença ácidos fenólicos, flavononas, flavonas, e isoflavonas na composição das tinturas e extratos de própolis vermelha. Com destaque dos compostos formononetina e Biochanina-A, identificados pelos seus respectivos padrões. Podemos ver que existem outros compostos com picos maiores como elucidado na literatura (ALDANA-MEJÍA *et al*, 2021), no entanto como objeto desse estudo foi a identificação da Biochanina-A e Formononetina encontrada no extrato da própolis vermelha em diferentes condições de temperatura em sua extração.

Como resultado encontramos dois picos de interesse nos cromatogramas (Figura 6), o melhor resultado de FN encontrado foram nas extrações em baixas temperaturas principalmente na temperatura de 0 °C e -10°C com área (18,063 cm³, 15,687 cm³) e com concentração de 0,115382479 ug/mL e 0,090936777 ug/mL respectivamente, isso devido congelamento da porção resinosa presente na amostra. A Biochanina-A obteve melhores resultados também nas mesmas condições de temperatura da FN a 0 °C e -10 °C com uma área de 1778,505 cm³ com concentração de 14,443 ug/mL e 1587,504 cm³ e concentração de 12,89 ug/mL.

TEMPERATURA	FORMONONETINA	BIOCHANINA A
-30	13,693	1344,63
-20	14,472	1575,893
-10	15,687	1587,504
0	18,063	1778,505
10	14,906	1507,941
20	11,584	1160,748
30	13,353	1343,467

Tabela (1): Temperaturas de extração e áreas das análise da cromatografia da formononetina e da Biochanina A.

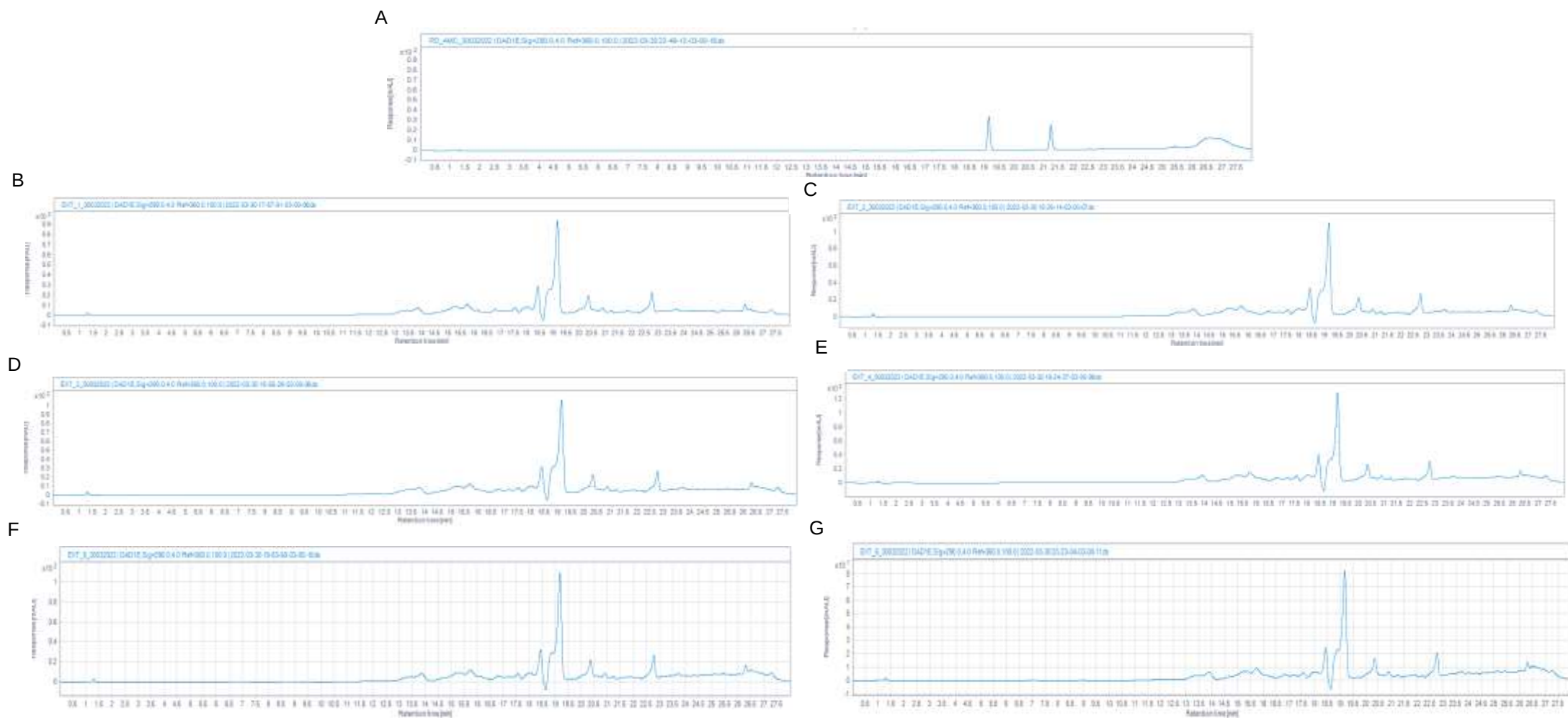


Figura 4: Cromatogramas do HPLC: (A) corresponde a curva padrão no primeiro pico a Biochanina A e o segundo pico a Formononetina, (B) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de -30 °C, (C) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de -20 °C, (D) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura -10 °C, (E) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de 0 °C, (F) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de 10 °C, (G) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de 20 °C e (H) Amostra do extrato de própolis vermelha na temperatura de 30 °C.

5.1.2 Microscopia de varredura

Na análise da morfologia estrutural das moléculas do extrato de própolis vermelha através da microscopia eletrônica de varredura após condições de estresse térmico tanto no preparo quanto no método de extração. Os resultados obtidos revelam que mesmo quando submetido a temperaturas reduzidas, não houve alterações significativas em sua estrutura molecular (Figura A e B)

Foi observado também que não ocorreu nenhuma modificação de porosidade do extrato mesmo em baixas temperaturas, isso nos mostra que a baixa temperatura não interfere na sua estrutura orgânica e nem que ocorra uma diminuição de agregados biológicos. Esses achados contribuem para uma compreensão mais abrangente das características intrínsecas dos extratos da própolis vermelha e suas aplicações com o encapsulamento do extrato em nanopartículas como também na indústria farmacêutica.

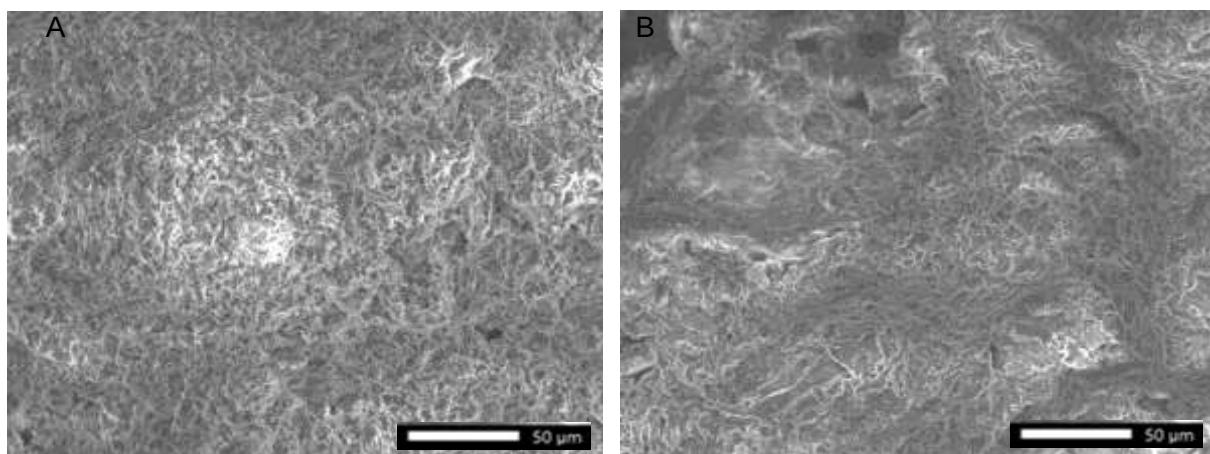


Figura 5: Imagem por microscopia de varredura (A) molécula do extrato de própolis vermelha a 30 °C na escala de 50 μm (B) molécula do extrato de própolis vermelha na escala de - 30 °C.

5.1.3 Termogravimétrica (TGA)

Na análise de perda de massa e a estabilidade térmica do extrato de própolis vermelha em diferentes condições, foi realizada pela TGA das amostras (gráfico A). Podemos notar que a extração á 0 °C teve uma estabilidade térmica até 300 °C mantendo de 100%, onde começou a ter a desidratação do material e uma perda considerável de massa de 20% na mesma temperatura, e ocorrendo uma perda de 40% nas temperaturas 300 °C – 450 °C. Nas amostras onde foi utilizado temperaturas de -30, -20, -10, 10, 20 e 30 °C a perda de peso devido ao aumento da temperatura até 200°C é devido à perda de umidade das amostras, sendo observada a queda da curva até 250 °C de aquecimento, ponto esse de degradação térmica. No entanto, com a elevação da temperatura ocorreu uma maior perda de peso das amostras,

principalmente nas faixas acima de 400 °C, podendo ser mais bem visualizado pela sua derivada da tangente na curva do DTG (gráfico B).

Este resultado nos mostra que independente da amostra ter sido congelada em seu preparo e com a presença de alguns metais pesados, isso não modificou sua composição orgânica, podendo ser visto no resultado nas faixas de 350 °C – 400 °C onde ocorre uma perda de massa considerável, devido a decomposição de vários compostos orgânicos, relacionada à uma possível queima de compostos orgânicos presentes nas amostras.

Mediante as diferentes massas analisadas, ocorreu certa diferença dos comportamentos das perdas de massa, no entanto sendo realizada uma normalização pode ser notado que o comportamento em todas as amostras é bem semelhante, o que leva a dizer que indiferente da temperatura de extração, para o presente estudo dos compostos analisados não houve diferença na termogravimétrica (TG).

EDS apresentou metais pesados isso pode modificar os padrões da minha amostra devido a mudança de temperatura.

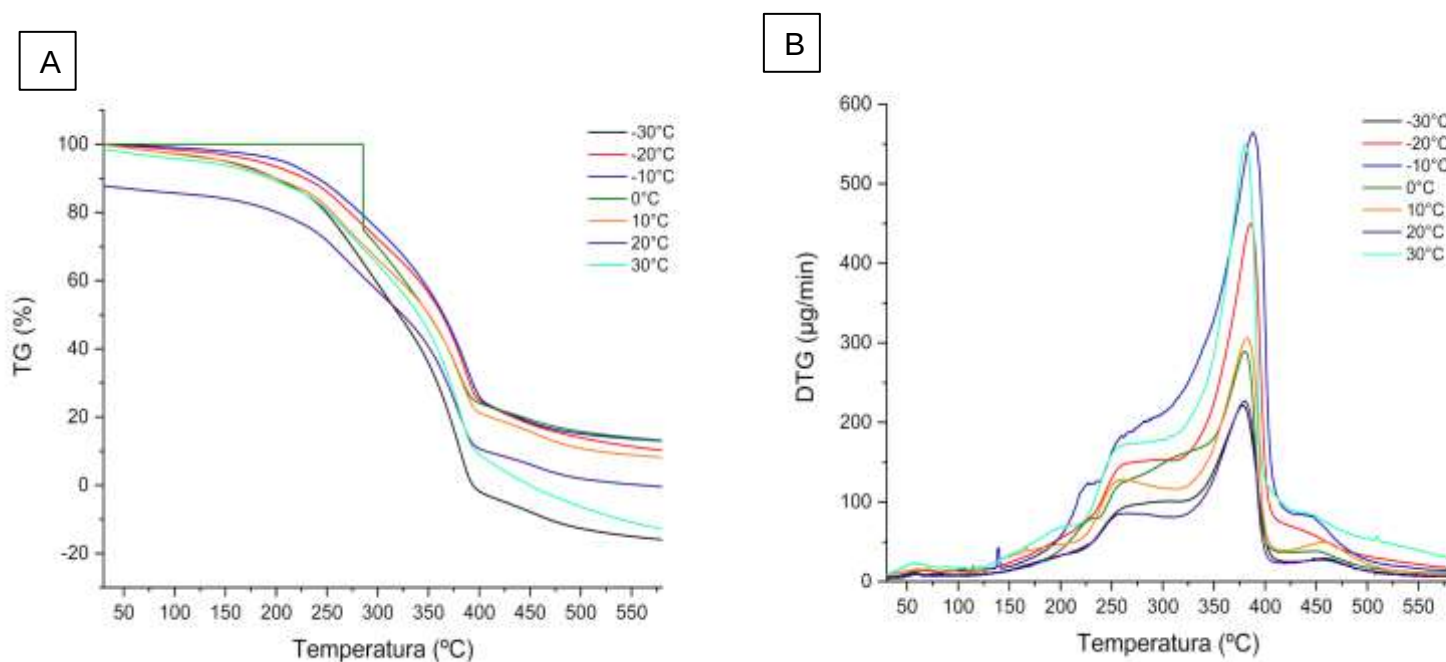


Figura 6: Curva de termogravimétrica do extrato de própolis vermelha em baixa temperatura. Onde a imagem "A" foi analisada a perda de massa em relação a temperatura e em "B" a derivada da termogravimétrica.

5.2 Ensaio *in vivo*

5.2.1 Avaliação comportamental

Após 19 dias da microinjeção da toxina 6-OHDA, o comportamento rotatório (CR) induzido por apomorfina foi observado em todos os animais e a intensidade das rotações foi > 2 voltas/min (> 90 voltas/45 min). Este teste é amplamente utilizado para avaliar a extensão da perda da inervação dopaminérgica em modelos animais para estudo da doença de Parkinson que utilizam a aplicação unilateral (hemiparkinsonismo) de 6-OHDA no estriado ou FPM, pois as rotações são observadas apenas com perdas de neurônios $\geq 80\%$ (ESKOW JAUNARAJIS et al., 2012; LIU et al., 2021). Primeiramente descrito por Ungerstedt (1971), o teste se baseia na regulação positiva dos receptores de dopamina tipo D2 como resposta plástica decorrente da perda de terminais pré-sinápticos no estriado homolateral à lesão e pode ser observado a partir de duas semanas após a aplicação unilateral de 6-OHDA no FPM. Como resultado, a aplicação de agonista dopaminérgico direto, como a apomorfina, estimula farmacologicamente os neurônios pós-sinápticos do lado lesionado, o que resulta em movimentos repetitivos de giro (PAXINOS, WATSON, 2014; ZHAI et al., 2018). Portanto, uma vez confirmada a efetividade da lesão dopaminérgica, os roedores foram aleatoriamente distribuídos em grupos denominados 6-OHDA/VC, L-DOPA/VC, L-DOPA/FN (vide quadro 4). Roedores que receberam aplicação intracerebral de veículo não desenvolvem hipersensibilidade pós-sináptica, não apresentam comportamento rotatório e, portanto, não foram considerados para esta análise.

Iniciados os tratamentos, os grupos foram avaliados pelo teste de MIA. A escala de avaliação de discinesias por meio de observação de movimentos involuntários anormais em ratos é amplamente utilizada na literatura, pois permite investigar mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao quadro, testar opções de tratamento e quantificar modificações comportamentais (BASTOS et al., 2021).

A avaliação das discinesias (MIA) foi realizada para os grupos de animais tratados com L-DOPA, ao primeiro e ao décimo primeiro dias de tratamento pós-cirúrgico. Quanto ao parâmetro locomotor, a análise estatística revelou interação significativa ($F(1,8) = 115,2$; $P < 0,0001$) entre as variáveis tratamento e tempo, com diferenças entre os tempos (1 e 21 dias, $F(1,8) = 28,80$; $P = 0,0007$) e entre os tratamentos ($F(1,8) = 128,6$; $P < 0,0001$, ANOVA de duas vias com medidas repetitivas). O pós-teste de Bonferroni mostrou que as diferenças entre os tratamentos (grupo L-DOPA/VC e L-DOPA/FN) foram evidentes ao 21º dia de tratamento ($P < 0,0001$, figura 7).

A análise do parâmetro global (MIA axiais, de membros e orofacial) mostrou interação significativa ($F(1,8) = 19,97$; $P = 0,0021$) entre as variáveis tratamento e tempo, sem diferenças significativas entre os tempos (1 e 21 dias, $F(1,8) = 1,342$; $P =$

0,2800), com diferenças entre os tratamentos ($F(1,8) = 8,748$; $P = 0,0182$, ANOVA de duas vias com medidas repetitivas). O pós-teste de Bonferroni mostrou que as diferenças entre os tratamentos (grupo L-DOPA/VC e L-DOPA/FN) foram evidentes ao 21º dia de tratamento ($P = 0,0006$, figura 7).

Nota-se assim que, com relação ao teste de MIA, não houve diferenças entre os grupos lesionados e submetidos ao tratamento com L-DOPA tratados com veículo ou FN no teste realizado no dia 1, seja no parâmetro locomotor ou global, indicando que o tratamento agudo com FN a 60 mg/kg não impede a manifestação das discinesias. Por outro lado, a administração subcrônica de FN promoveu diminuição significativa em ambos os parâmetros analisados. Além disso, quando feitas comparações múltiplas entre os tempos, observa-se uma diminuição das discinesias para o parâmetro locomotor ($F(1,8) = 28,80$; $P = 0,00007$).

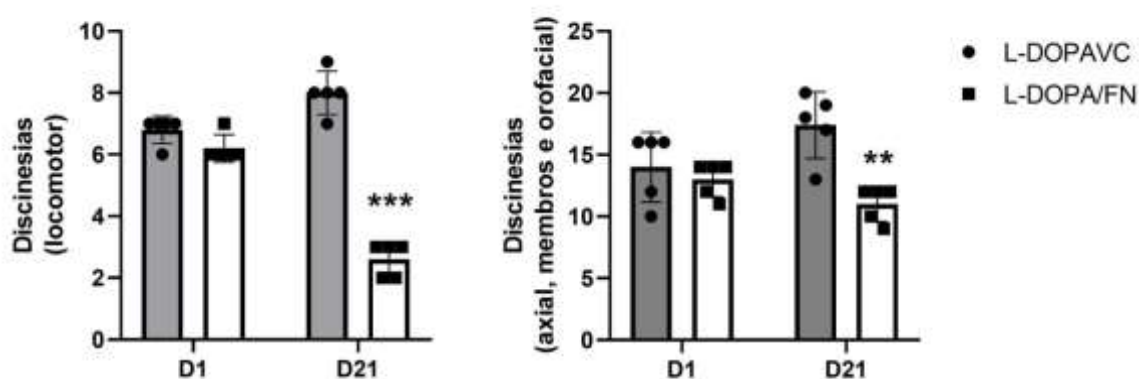


Figura 7: Resultados do teste de movimentos involuntários anormais (MIA/discinesias induzidas por L-DOPA) realizados no 1º (D1) e 21º (D21) dias de administração dos tratamentos, quanto aos parâmetros locomotor (à esquerda) e global (soma dos escores de discinesias de membros superior, axial e orofacial, à direita). L-DOPA/VC: grupo lesionado e tratado com L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina, 20 mg/kg) e veículo (formulação sem a FN); L-DOPA/FN: grupo lesionado e tratado com L-DOPA e FN a 60 mg/kg. ** indica diferença significativa em relação ao L-DOPA/VC, com valor de $P < 0,001$; *** indica diferença significativa em relação ao L-DOPA/VC, com valor de $P < 0,0001$ (ANOVA de duas vias com medidas repetitivas e pós-teste de Bonferroni). As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média (EPM). Apenas roedores tratados com L-DOPA eliciam os movimentos involuntários anormais, portanto, animais que receberam veículo (grupos Sham e 6-OHDA) não foram considerados para esta análise.

A diminuição das discinesias após tratamentos com FN pode estar relacionada às ações biológicas da FN como um agente antioxidante (MU *et al.*, 2009) e anti-inflamatório sobre o sistema nervoso (SUN *et al.*, 2011). Esta hipótese se baseia na etiopatogenia das discinesias, cujo desenvolvimento e progressão incluem o estresse oxidativo resultante da produção de óxido nítrico e a neuroinflamação: A dopamina é metabolizada por neurônios e astrócitos, de modo que a administração em longo prazo da L-DOPA (precursor dopaminérgico), leva à produção de espécies reativas de oxigênio. Tais produtos promovem a ativação de células microgliais que liberam mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e IL-6 (LANZA *et al.*, 2019), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BORTOLANZA *et al.*, 2015) e induzem o aumento da expressão da enzima sintase de óxido nítrico (iNOS) (ISSY *et al.*, 2018). Astrócitos ativados também expressam iNOS e produzem quantidades aumentadas de NO, que podem ser tóxicas para os neurônios (BORTOLANZA *et al.*, 2015). De fato, já foi observado que a inibição da produção de óxido nítrico diminui as discinesias em roedores (PADOVAN-NETO *et al.*, 2015). Neste sentido, diferentes trabalhos mostraram que a administração de FN diminui a resposta inflamatória, com redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico (LI *et al.*, 2018; BUENO-SILVA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015; EL-BAKOUH; OLAJIDE, 2018; LI *et al.*, 2018).

Outra explicação para o surgimento e evolução das discinesias está associada ao desequilíbrio glutamatérgico causado pelo tratamento com L-DOPA (SEBASTIANUTTO E CENCI, 2018, POURMIRBABAEI ET AL., 2019). Após o tratamento crônico com L-DOPA em indivíduos com DP, a transmissão na via de sinalização do glutamato muda adaptativamente do córtex para o corpo estriado, resultando na liberação excessiva de glutamato da extremidade pré-sináptica e consequente atividade e distribuição anormais de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios estriatais (MELLONE, GARDONI, 2018). Os antagonistas dos receptores de glutamato, particularmente os antagonistas dos receptores NMDA, podem inibir os movimentos involuntários anormais em modelos animais de DP (BRIGHAM *et al.*, 2018). Deste ponto vista, é interessante notar que a FN foi capaz de inibir receptores NMDA e diminuir sua regulação positiva em modelos experimentais, promovendo efeito ansiolítico (WANG *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2013).

Apesar dos efeitos adversos (MIA/discinesias), o tratamento com L-DOPA permanece como padrão para a DP devido ao alívio de sintomas motores como a bradicinesia, especialmente nos estágios iniciais do tratamento (LANE, 2018). Assim, compreende-se que novos candidatos a fármacos antidiscinéticos não devem prejudicar o efeito antiparkinsoniano da L-DOPA. No presente estudo, o teste de cilindro foi utilizado para a avaliação de déficits motores, especificamente quanto à anormalidade no uso dos membros superiores: quanto menor o uso da pata contralateral à lesão,

maior o comprometimento da função motora (IGARASHI et al., 2015). Observou-se uma diminuição da porcentagem de toques contralaterais no grupo 6-OHDA/VC (lesionado sem tratamento) comparado ao grupo Sham ($P = 0,0023$) e uma reversão deste efeito em animais lesionados tratados com L-DOPA (grupo L-DOPA/VC x grupo 6-OHDA/VC, $P = 0,0243$). Nota-se que a administração da FN não interferiu com o efeito antiparkinsoniano da L-DOPA, pois não houve diferenças significativas entre os grupos L-DOPA/VC e L-DOPA/FN entre si ($P = 0,9077$), nem entre os grupos L-DOPA/VC e L-DOPA/FN em relação ao grupo Sham ($P = 0,5968$ e $P = 0,25559$, respectivamente). Quando comparados os grupos L-DOPA/FN e 6-OHDA/VC, observou-se uma tendência ao aumento no grupo tratado com FN ($P = 0,0794$) (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, $F(3,15) = 6,921$; $P = 0,038$, comparações entre os tratamentos, figura 8).

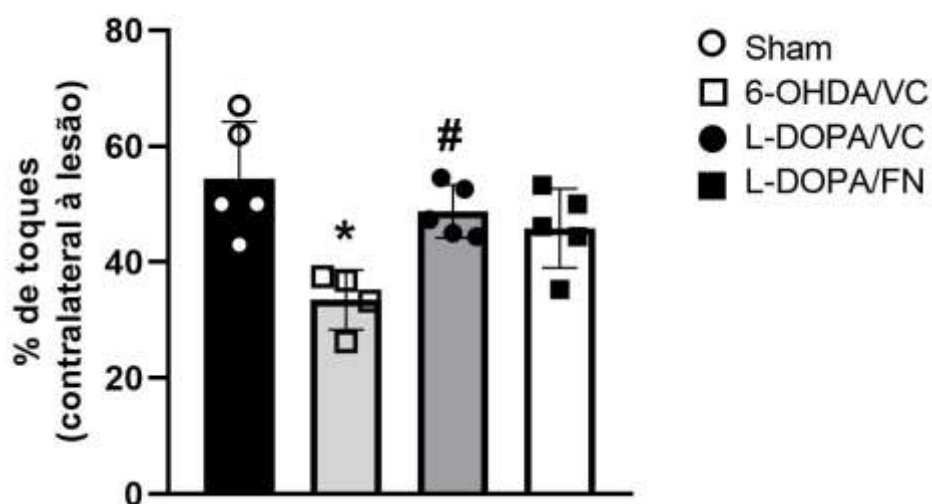


Figura 8: Resultados do teste do cilindro realizado ao 21º dia de administração dos tratamentos. Sham: grupo não lesionado e tratado (v.o.) com veículo; 6-OHDA/VC: grupo lesionado e tratado (v.o.) com veículo; L-DOPA/VC: grupo lesionado e tratado com L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina a 20 mg/kg) e veículo (formulação sem a FN); L-DOPA/FN: grupo lesionado e tratado com L-DOPA e FN a 60 mg/kg. * indica diferença significativa em relação ao grupo Sham, com valor de $P < 0,01$; # indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA/VC, com valor de $P < 0,01$ (ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey). As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média (EPM).

Além de ser útil como indicador da função motora, as menores médias de toques com os membros contralaterais à lesão no teste do cilindro são indicativas de perda de ao menos 40% de neurônios dopaminérgicos (BOIX et al., 2015) do lado lesionado. Esse resultado é corroborado pela análise histológica quanto à imunorreatividade para TH.

5.1.2 Avaliação histológica

Para a quantificação de neurônios dopaminérgicos remanescentes na SNpc foi realizada a imunohistoquímica para TH. Como esperado, todos os animais que

receberam 6-OHDA apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo Sham, [(F (3, 36) = 60,25; $P < 0,0001$, ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, figura 9], com perdas neuronais acima de 80% induzidas pela aplicação de 6-OHDA. Embora todos os grupos lesionados tenham apresentado característica de perda severa de neurônios dopaminérgicos, quando estes foram comparados entre si [(F (2, 27) = 10,03; $P = 0,0006$], notou-se que o tratamento com a FN aumentou o índice de sobrevivência em relação aos grupos 6-OHDA/VC ($P = 0,0006$) e L-DOPA/VC ($P = 0,0091$), o que sugere uma possível ação neuroprotetora.

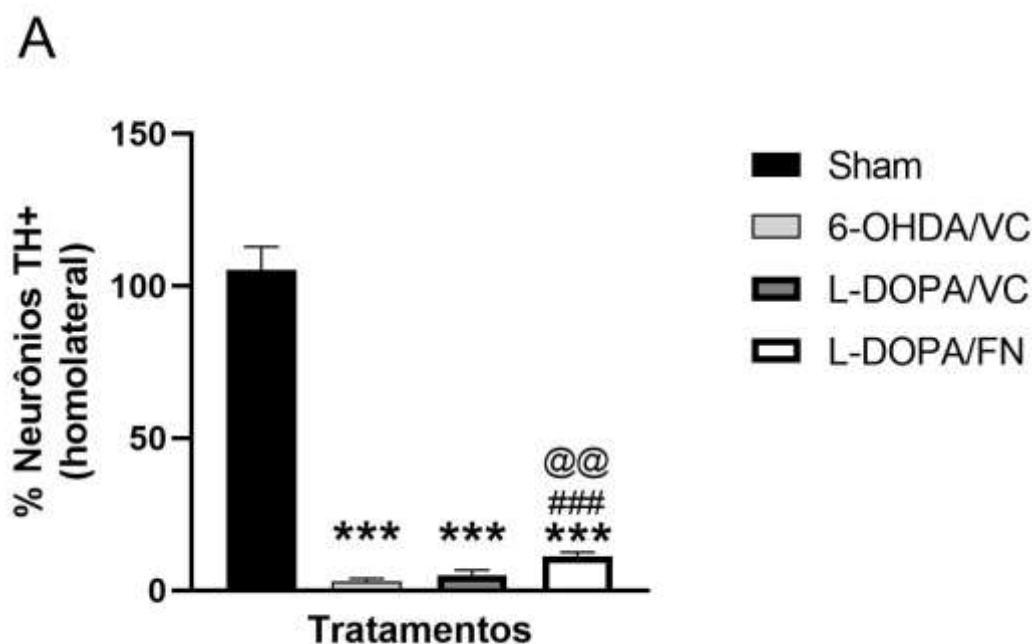


Figura 9: Resultados da quantificação de células imunorreativas para tirosina-hidroxilase (TH), expressos em porcentagem em relação ao lado intacto, depois de 21 dias de administração dos tratamentos. Sham: grupo não lesionado e tratado (v.o.) com veículos; 6-OHDA/VC: grupo lesionado e tratado (v.o.) com veículos; L-DOPA/VC: grupo lesionado e tratado com L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina a 20 mg/kg) e veículo (formulação sem a FN); L-DOPA/FN: grupo lesionado e tratado com L-DOPA e FN a 60 mg/kg. *** indica diferença significativa em relação ao grupo Sham, com valor de $P < 0,0001$; ### indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA/VC, com valor de $P < 0,0001$; @@ indica diferença significativa em relação do grupo L-DOPA/VC com $P < 0,001$ (ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey). As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média (EPM).

Os efeitos neuroprotetores da FN são bem descritos na literatura. Em estudo utilizando cultura primária de mesencéfalo submetida à neurodegeneração dopaminérgica induzida por lipopolissacarídeo, a administração de FN diminuiu a morte celular e aumentou a captação de dopamina, ao mesmo tempo em que inibiu a ativação microglial e a liberação de TNF- α , NO e superóxidos (CHEN et al., 2008). Também há relatos da ação neuroprotetora da FN relacionada à diminuição da morte celular por apoptose: Administrada *in vitro* (TIAN et al., 2013), a FN promoveu neuroproteção em neurônios corticais expostos à citotoxicidade induzida por agonista NMDA, com

aumento dos níveis de proteínas Bcl-2 (efeito anti-apoptótico) e diminuição dos níveis de proteínas Bax e caspase-3 (efeito pró-apoptóticas). Em estudo *in vivo* (LIANG *et al.*, 2014) utilizando modelo animal de isquemia cerebral/reperfusão tecidual, a FN mostrou efeito neuroprotetor associado à regulação negativa da relação Bax/Bcl-2 e à ativação da via de sinalização PI3K/Ak (associada à proliferação e crescimento celular).

Além de apresentar atividade biológica neuroprotetora, a FN foi associada também à neurogênese hipocampal, em camundongos tratados cronicamente com corticosterona para indução de depressão (Zhang *et al.*, 2022). Em adição, a utilização de um extrato de própolis vermelha rico em FN promoveu melhora funcional frente à lesão de nervo periférico em ratos, observando-se aumento do número de axônios mielinizados (BARBOSA *et al.*, 2016). Esses achados se relacionam com os resultados do presente trabalho na medida em que a indução de neurogênese e a modulação de vias relacionadas à diferenciação e crescimento neuronal podem ser úteis para explicar a presença de células remanescentes na SNpc mesmo após uma lesão severa da via nigroestriatal.

Ao mesmo tempo, estudos associam o efeito neuroprotetor da FN à diminuição do estresse oxidativo e da neuroinflamação em diferentes desordens do sistema nervoso como doença de Alzheimer, demência, isquemia cerebral, ansiedade e depressão (revisado por TIAN *et al.*, 2022). Por exemplo, a administração de FN em modelo de lesão cerebral traumática mostrou-se protetora através da inibição do estresse oxidativo e ativação de vias dependentes de Nrf2 (LI *et al.*, 2017). Esses mecanismos ajudam a explicar os achados histológicos e podem também ser subjacentes ao efeito antidiscinético da FN, uma vez que a etiopatogenia das discinesias inclui respostas microgliais e astrocitárias com produção de mediadores inflamatórios (LANZA *et al.*, 2019; BORTOLANZA *et al.*, 2015), como descrito anteriormente.

No presente estudo, os resultados da análise da expressão de GFAP, marcador de astrócitos, evidenciou um aumento das médias encontradas nos grupos lesionados (6-OHDA/VC e L-DOPA/VC) em relação ao grupo Sham (ambos com $P < 0,0001$), exceto o grupo L-DOPA/FN. As médias deste grupo (L-DOPA/FN) foram significativa menores em relação aos grupos 6-OHDA/VC ($P < 0,0001$) e L-DOPA/VC ($P = 0,0008$) (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, $F(3, 33) = 32,72$; $P < 0,0001$, figura 10).

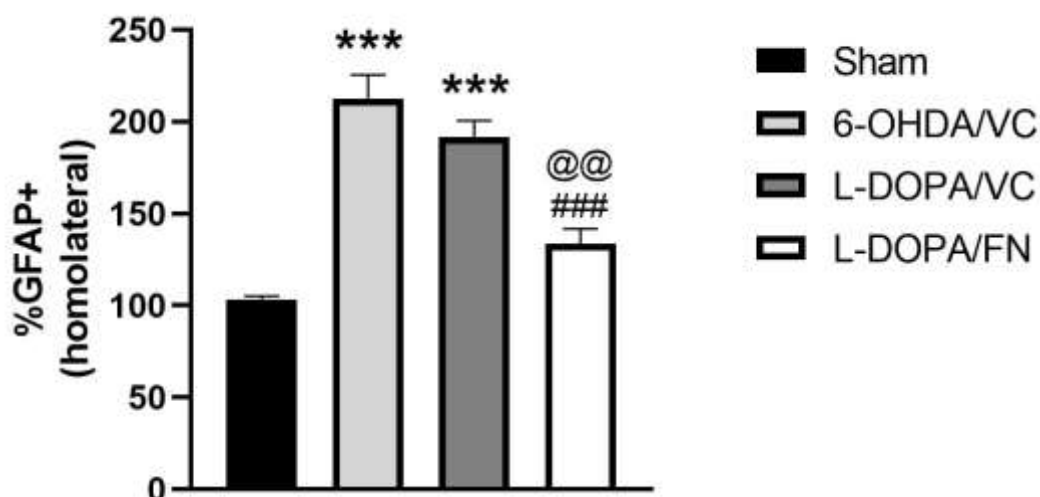


Figura 10: Resultados da quantificação de células imunorreativas para proteína glial fibrilar ácida presente em astrócitos (GFAP), expressos em porcentagem em relação ao lado intacto, depois de 21 dias de administração dos tratamentos. Sham: grupo não lesionado e tratado (v.o.) com veículos; 6-OHDA/VC: grupo lesionado e tratado (v.o.) com veículos; L-DOPA/VC: grupo lesionado e tratado com L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina a 20 mg/kg) e veículo (formulação sem a FN); L-DOPA/FN: grupo lesionado e tratado com L-DOPA e FN a 60 mg/kg. *** indica diferença significativa em relação ao grupo Sham, com valor de $P < 0,0001$; ### indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA/VC, com valor de $P < 0,0001$; @@ indica diferença significativa em relação do grupo L-DOPA/VC com $P < 0,001$ (ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey). As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média (EPM).

Nota-se, portanto, que a administração de FN diminuiu a reação astrocitária decorrente do tratamento com L-DOPA e também da lesão *per se*. Embora não existam estudos prévios que tenham investigado a relação da FN com a reação astrocitária induzida por L-DOPA, tem sido descrito que a FN pode inibir a ativação de microglia, astrócitos e macrófagos e a liberação de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e NO por meio de vias de sinalização que envolvem o fator de transcrição NF- κB (GENG, JIANG, 2022). Tal ação da formononetina pode ser particularmente interessante, pois foi relatado que, após aplicação de 6-OHDA e tratamento com L-DOPA em roedores, ocorre uma proeminente resposta astrocitária, associada ao aumento dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (PEREIRA et al., 2020).

Outros estudos pré-clínicos mostraram a ocorrência de um microambiente inflamatório no núcleo estriado, que acompanha a depleção de dopamina, com ativação sustentada de astrócitos, microglia e ciclooxigenase-2 (COX-2), que contribuem para o surgimento e progressão das discinesias induzidas por L-DOPA (BORTOLANZA et al., 2015, 2021; NASCIMENTO et al., 2023; MULAS et al., 2016). Apoiando esta premissa, tem sido observado que terapias farmacológicas com compostos antioxidantes e anti-inflamatórios, como a FN (BARBOSA et al., 2015; LIMA-CAVENDISH et al., 2015) diminuem a gravidade das discinesias (BOI et al., 2019; DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2016; PADOVAN-NETO et al., 2009, 2015). Cabe destacar que os dados do presente estudo apontam para uma possível utilização da FN tanto como estratégia para

tratamento de discinesias e de sintomas motores na DP quanto como um agente neuroprotetor.

6 Conclusão

A utilização do método extração por líquidos pressurizados em baixas temperaturas mostrou-se eficaz para a obtenção de um extrato de própolis vermelha com elevado teor de isoflavonas (formononetina e biochanina A);

A administração sub-crônica de formononetina a 60 mg/kg por via oral diminuiu as discinesias induzidas por L-DOPA em roedores, sem perda do efeito terapêutico (motor) da L-DOPA, ao mesmo tempo em que evitou a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos;

Os efeitos observados pela administração da FN podem estar relacionados à diminuição da reação astrocitária.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G.R.; LEMOS, T.L.G.; DORNELAS, C.A.; SILVA, A.M.; ALMEIDA, M.C.S.; FERREIRA, D.A. et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. *Revista Virtual de Química* 2018; 10(1): 2–12.
- ALDANA-MEJIA, Jennyfer A. et al. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 198, p. 114029, 2021.
- ANDRADE, J.K.S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C.S.; NUNES, M.L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International* 2017; 101: 129-138.
- ANJUM, S. et al. Study on thermal stability and degradation kinetics of PVA-PEG blends for food packaging applications. *Polymer Bulletin*, v. 78, n. 4, p. 2005-2024, 2021.
- ANNUNCIAÇÃO, D.R.L.; ALMEIDA, F.V.; HARAD, E.L.Y.; GRASSIB, M.T.; SODRÉA, F.F. Éteres Difenílicos Polibromados (PBDE) como contaminantes persistentes: ocorrência, comportamento no ambiente e estratégias analíticas. *Quim. Nova* 2018; 41(7): 782-795
- AYANO, G. Parkinson's Disease: A Concise Overview of Etiology, Epidemiology, BAGGA, V.; DUNNETT, S.B.; FRICKER, R.A. The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease – Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. *Behavioural Brain Research* 2015; 15: 107-117.
- BARBOSA RA, NUNES TLGM, NUNES TLGM, PAIXÃO AO, BELO-NETO R, MOURA S, ALBUQUERQUE-Jr RLC, CÂNDIDO EAF, PADILHA FF, QUINTANS-Jr LJ, GOMES MZ, CARDOSO JC. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54:993-1004, 2016.
- BARGIOTAS, P.; KONITSIOTIS, S. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: emerging treatments. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2013; 9: 1605-1617.
- BARRETO, GDA, CERQUEIRA, JC, REIS, JHDO, HODEL, KVS, GAMA, LA, ANJOS, JP, ... & MACHADO, BAS. Avaliação do Potencial dos Extratos de Própolis Vermelha Brasileira: Uma Análise da Composição Química e Propriedades Biológicas. *Ciências Aplicadas* 2022; 12 (22), 11741.
- BARROSO SS. Efeitos comportamentais do exercício e do extrato de própolis vermelha sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos em ratos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes. Sergipe, p. 97, 2013.
- BASSANI TB, VITAL MA, RAUH LK. Neuroinflammation in the pathophysiology of BASTOS, T. G. et al. Current animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: A systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 109, p. 110219, 2021.
- BECKER, B.; DEMIRBAS, M.; JOHANN, S.; ZENDEDEL, A.; BEYER, C.; CLUSMANN, H.; HAAS, S.J.; WREE, A.; TAN, S.K.H.; KIPP, M. Effect of Intrastriatal 6-OHDA Lesions on Extrastriatal Brain Structures in the Mouse. *Molecular Neurobiology* 2017; 55:4240-4252.
- BIDO, S.; MARTI, M.; MORARI, M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. *Journal of Neurochemistry* 2011; 118:1043-55.
- BISWAS, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; 15: 8:155.
- BLOEM, Bastiaan R.; OKUN, Michael S.; KLEIN, Christine. Parkinson's disease. *The Lancet* 2021; v. 397, n. 10291, p. 2284-2303.

Boi L., Pisanu A., Greig N. H., Scerba M. T., Tweedie D., Mulas G., Fenu S., Carboni E., Spiga S., Carta A. R. (2019). Immunomodulatory drugs alleviate L-dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(12), 1818–1830.

BOIX, J.; VON HIEBER, D.; CONNOR, B. Gait Analysis for Early Detection of Motor Symptoms in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2018; 6: 12-39.

BORDIA, Tanuja; PEREZ, Xiomara A. Cholinergic control of striatal neurons to modulate L-dopa-induced dyskinesias. *European Journal of Neuroscience* 2019; v. 49, n. 6, p. 859-868.

BORTOLANZA M, BARIOTTO-DOS-SANTOS KD, DOS-SANTOS-PEREIRA M, DA-SILVA CA, DEL-BEL E. Antidyskinetic Effect of 7-Nitroindazole and Sodium Nitroprusside Associated with Amantadine in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*. 30:88-100, 2016.

BORTOLANZA M, CAVALCANTI-KIWIATKOSKI R, PADOVAN-NETO FE, DA-SILVA CA, MITKOVSKI M, RAISMAN-VOZARI R, DEL-BEL E. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 73:377–387, 2015.

BORTOLANZA M., DO NASCIMENTO G. C., RAISMAN-VOZARI R., DEL-BEL E. (2021). Doxycycline and its derivative, COL-3, decrease dyskinesia induced by L-DOPA in hemiparkinsonian rats. *British Journal of Pharmacology*, 178(13), 2595–2616,

BOUABID, S.; TINAKOUA, A.; LAKHDAR-GHAZAL, N.; BENAZZOUZ, A. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *Journal of Neurochemistry* 2016; 136:677-691.

BRIGHAM EF, JOHNSTON TH, BROWN C, HOLT JDS, FOX SH, HILL MP, HOWSON PA, Brochie JM, Nguyen JT. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Correlation Analysis of Amantadine for Levodopa-Induced Dyskinesia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 Nov;367(2):373-381. doi: 10.1124/jpet.118.247650. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30087157.

BROOKS, S.P.; DUNNETT, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10:519-29.

BUENO-SILVA, B., KAWAMOTO, D., ANDO-SUGUIMOTO, E., CASARIN, R., ALENCAR, S., ROSALEN, P., MAYER, M., 2017. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *Journal of Ethnopharmacology* 207.

BÚFALO, M. C., FERREIRA, I., COSTA, G., FRANCISCO, V., LIBERAL, J., CRUZ, M. T., & LOPES, M. C. (2020). Anti-inflammatory activity of red propolis extract: evidences for a different mechanism in microglial cells. *Food & function*, 11(2), 1507-1521.

CALABRESE, V.; SANTORO, A.; MONTI, D.; CRUPI, R.; DI PAOLA, R.; LATTERI, S.; CARTA, A.R.; MULAS, G.; BORTOLANZA, M.; DUARTE, T.; PILLAI E, FISONE G, VOZARI RR, DEL-BEL E. L-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? *European Journal of Neuroscience* 2017; 45: 73-91.

CARTA, A.R.; MULAS, G.; BORTOLANZA, M.; DUARTE, T.; PILLAI E, FISONE G, CARTA, M.; BEZARD, E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience* 2011; 198:245-51.

CARTA, M.; CARLSSON, T.; KIRIK, D.; BJÖRKLUND, A. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 2007; 130: 1819-1833.

CENCI MA, LEE CS, BJORKLUND A. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin and glutamic acid decarboxylase mRNA. *European Journal of Neuroscience*, 10:2694–2706., 1998.

CENCI, M.A.; CROSSMAN, A.R. Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2018, 1-11.

CENCI, M.A.; LUNDBLAD, M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry* 2006; 99: 381-392.

Chen HQ, Wang XJ, Jin ZY, Xu XM, Zhao JW, Xie ZJ. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. *Neurosci Res.* 2008 Oct;62(2):123-30. doi: 10.1016/j.neures.2008.07.001. Epub 2008 Jul 16. PMID: 18675857.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA Disponível em; http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_37_de_15022018.html>. Acesso em: 08 de junho de 2018.

CUNHA, Andréia S. *et al.* Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. *Behavioural brain research*, v. 312, p. 64-76, 2016.

CUZZOCREA, S.; ZAPPIA, M.; GIORDANO, J.; CALABRESE, E.J.; FRANCESCHI, C. DA SILVA, R.O.; ANDRADE, V.M.; BULLÉ RÊGO E.S.; AZEVEDO DÓRIA G.A.; SANTOS LIMA, B.D.; DA SILVA, F.A.; DE SOUZA ARAÚJO, A.A.; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.; CARDOSO, J.C.; ZANARDO, M.G. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal Ethnopharmacology* 2015; 170: 66-71.

DAVID, L.S.; SAINT-PIERRE, M.; LAMONTAGNE-PROULX, J.; CICCHETTI, F. The effects of cysteamine in a mouse model of levodopa-induced dyskinesias. *Neuroscience Letters* 2018; 662:395-401.

DAVIES, W.L.; GRUNERT, R.R.; HAFF, R.F.; MCGAHEN, J.W.; NEUMAYER, E.M.; PAULSHOCK, M.; WATTS, J.C.; WOOD, T.R.; HERMANN, E.C.; HOFFMANN, C.E. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science* 1964; 144: 862– 863.

DHALL, R.; KREITZMAN, D.L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. *Neurology* 2016; 86:S13-24.

Diagnosis, Comorbidity and Management. *Journal of Neurological Disorders* 2016; 4: DIKSHA; SINGH, Lovedeep; BHATIA, Deepika. Mechanistic interplay of different mediators involved in mediating the anti-depressant effect of isoflavones. *Metabolic Brain Disease*, v. 39, n. 1, p. 199-215, 2024.

DOO, A. R., Kim, S. N., Hahm, D. H., Yoo, H. H., Park, J. Y., Lee, H., ... & Park, H. J. *Gastrodia elata* Blume alleviates L-DOPA-induced dyskinesia by normalizing FosB and ERK activation in a 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease mouse model. *BMC complementary and alternative medicine* 2014; 14(1), 107.

DOPA-induced dyskinesia are accompanied by heightened neuroinflammation in the hemi-

Dos Santos Pereira M, Abreu GHD, Rocca J, Hamadat S, Raisman-Vozari R, Michel PP, Del Bel E. Contributive Role of TNF- α to L-DOPA-Induced Dyskinesia in a Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease. *Front Pharmacol.* 2021 Jan 11;11:617085.

DOS-SANTOS-PEREIRA, Maurício *et al.* Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: possible mechanism of action. *Neurobiology of disease*, v. 94, p. 179-195, 2016.

EL-BAKOUSH, Abdelmeniem; OLAJIDE, Olumayokun A. Formononetin inhibits neuroinflammation and increases estrogen receptor beta (ER β) protein expression in BV2 microglia. *International immunopharmacology* 2018; v. 61, p. 325-337.

El-Sherbeeney NA, Soliman N, Youssef AM, Abd El-Fadeal NM, El-Abaseri TB, Hashish AA, Abdelbasset WK, El-Saber Batiha G, Zaitone SA. The protective effect of biochanin A against rotenone-induced neurotoxicity in mice involves enhancing of PI3K/Akt/mTOR signaling and beclin-1 production. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020 Dec 1;205:111344. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111344. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977283.

ESPAY, A.J.; MORGANTE, F.; MEROLA A, FASANO A, MARSILI L, FOX SH, BEZARD E, PICCONI B, CALABRESI P, LANG AE. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Annals of Neurology* 2018; 84:797-811.

FAZL, A.; FLEISHER, J. Anatomy, Physiology, and Clinical Syndromes of the Basal Ganglia: A Brief Review. *Seminars in Pediatric Neurology* 2018; 25:2-9.

Feng Z-J, Lai W-F. Chemical and Biological Properties of Biochanin A and Its Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics.* 2023; 15(4):1105. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041105>

FENG, Yongwei *et al.* The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the acute lung injury induced by sulfur mustard. *Stem cell research & therapy*, v. 10, n. 1, p. 90, 2019.

Freires IA, de Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem.* 2016 Mar 3;110:267-79.

FREITAS, M.E.; FOX, S.H. Nondopaminergic treatments for Parkinson's disease: current and future prospects. *Neurodegenerative Disease Management* 2016; 6:249-68.

FROZZA, C.O.; GARCIA, C.S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 52:137-142.

FU, X. *et al.* Formononetin ameliorates cognitive disorder via PGC-1 α pathway in neuroinflammation conditions in high-fat diet-induced mice. *CNS & neurological disorders drug targets*, 2019.

Geng, Long-Mei; Jiang Jian-Guo. The neuroprotective effects of formononetin: Signaling pathways and molecular targets, *Journal of Functional Foods*, Volume 88, 2022, 104911.

GETACHEW, A. T., HOLDT, S. L., MEYER, A. S., & JACOBSEN, C. Effect of extraction temperature on pressurized liquid extraction of bioactive compounds from *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs* 2022; v. 20, n. 4, p. 263.

GOMES MZ, RAIZMAN-VOZARI R., DEL BEL EA. A nitric oxide inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Research*, 1203:160 – 169, 2008.

GULUNAY, A., CAKMAKLI, GY, YON, MI, ULUSOY, EK E KARAKOC, M. Frequência de sintomas não motores e seu impacto na qualidade de vida em pacientes com doença de Parkinson: uma série de casos descritivos prospectivos. *Psicogeriatría* 2020; 20 (2), 206-211.

GUO M, LU H, QIN J, QU S, WANG W, GUO Y, LIAO W, SONG M, CHEN J, WANG Y. BIOCHANIN A Provides Neuroprotection Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Nrf2-Mediated Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation Signaling Pathway in Rats. *Med Sci Monit.* 2019 Nov 26;25:8975-8983.

HASSANZADEH, K., & RAHIMMI, A. Oxidative stress and neuroinflammation in the story of Parkinson's disease: could targeting these pathways write a good ending?. *Journal of cellular physiology* 2019; 234(1), 23-32.

HOON, M.; PETZER, J.P.; VILJOEN, F.; PETZER, A. The Design and Evaluation of na l-Dopa-Lazabemide Prodrug for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules* 2017; 22.

IDRUS, N.F.M.; YIAN, L.N.; IDHAM, Z.; ARIS, N.A.; PUTRA, N.R.; AZIZ, A.H.A. *et al.* Mini review: Application of supercritical carbon dioxide in extraction of propolis extract. *Synthesis* 2018; 14(4): 397-402.

IGARASHI M, HABATA T, AKITA H, NODA K, OGATA M, SAJI M. The NR2B antagonist, ifenprodil, corrects the l-DOPA-induced deficit of bilateral movement and reduces c-Fos expression in the subthalamic nucleus of hemiparkinsonian rats. *Neurosci Res.* 2015 Jul;96:45-53. doi: 10.1016/j.neures.2015.02.003. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25697393.

ISSY, A.C., NASCIMENTO, G.C., ABREU, G.H.D., TRISTÃO, F.S., DEL-BEL, E., DUARTE, T., BORTOLANZA, M., 2018. Differential behavioral and glial responses induced by dopaminergic mechanisms in the iNOS knockout mice. *Behav Brain Res* 350, 44-53.

JIANG, Dongjun *et al.* Potential anticancer properties and mechanisms of action of formononetin. *BioMed research international*, v. 2019, 2019.

JUÁREZ OLGUÍN, H.; CALDERÓN GUZMÁN, D.; HERNÁNDEZ GARCÍA, E.; BARRAGÁN MEJÍA, G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016

KAUR R, MEHAN S, SINGH S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurological Sciences* 2018.

KAUR, K.; GILL, J.S.; BANSAL, P.K.; DESHMUKH, R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2017; 381:308-314.

KIM, Aryun *et al.* Amantadine and the risk of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease: an open-label, pragmatic trial. *Journal of movement disorders*, v. 11, n. 2, p. 65, 2018.

Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2014). *Fundamentals of human neuropsychology*. Macmillan International Higher Education. Capítulo 3: Neural substrates of behavior.

KRAEUTER, Ann-Katrin; GUEST, Paul C.; SARNYAI, Zoltán. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Pre-clinical models: techniques and protocols*, p. 99-103, 2019.

KUBILIENE, L.; JEKABSONE, A.; ZILIUS, M.; TRUMBECKAITE, S.; SIMANAVICIUTE, D.; GERBUTAVICIENE, R.; MAJIENE, D. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2018; 18:165.

Kunz, M. R., Bujak, R., Muntean, C. M., & Huck, C. W. (2021). Effects of water on infrared spectroscopy of biological tissues and biomolecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(7), 1869-1879. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03198-w>

Kusuma, I. W., Sulistyowati, L., & Yuswanto, A. (2021). Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Identification and Quantification of Polyphenolic Compounds in Red Propolis from Indonesia. *Journal of AOAC International*, 104(3), 807-813.

Lane EL. L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill. *Eur J Neurosci*. 2019 Feb;49(3):384-398. doi: 10.1111/ejn.14119. Epub 2018 Sep 16. PMID: 30118169.

Lanza, K., Perkins, A.E., Deak, T., Bishop, C., 2019. Late aging-associated increases in L-

LI, Chia-Ling *et al.* Immunoregulatory effects of very low density lipoprotein from healthy individuals and metabolic syndrome patients on glial cells. *Immunobiology*, 2019.

LI, Z., DONG, X., ZHANG, J., ZENG, G., ZHAO, H., LIU, Y., QIU, R., MO, L., YE, Y., Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. *Journal of the neurological sciences*. 15, 112-117. 2014.

LI, Zhengzhao *et al.* Increased miR-155 and heme oxygenase-1 expression is involved in the protective effects of formononetin in traumatic brain injury in rats. *American journal of translational research*, v. 9, n. 12, p. 5653, 2017.

LI, Zhengzhao *et al.* Neuroprotective effect of formononetin against TBI in rats via suppressing inflammatory reaction in cortical neurons. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 349-354, 2018.

LI, Zhengzhao *et al.* Neuroprotective effect of formononetin against TBI in rats via suppressing inflammatory reaction in cortical neurons. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 349-354, 2018.

Liang, Y., Li, Y., Li, H., Liu, X., Wang, L., & Zhang, F. (2014). Formononetin, a flavonoid extracted from *Astragalus membranaceus*, ameliorates oxidative damage in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein by inhibiting the MAPK signaling pathways. *Pharmacology*, 94(3-4), 141-150.

LIMA CAVENDISH, R.; DE SOUZA SANTOS J.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, O. A.; OLIVEIRA, J. V.; ARAUJO, E. D.; SILVA, A. A. B.; THOMAZZI, M. S.; CARDOSO, C. J.; GOMES, Z. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 15 (173): 127-33.

Liu, M., Yang, L., Ma, H., & Zhang, X. (2021). Assessment of Rotational Behavior in a 6-Hydroxydopamine-Induced Rat Model of Parkinson's Disease: Comparison of Different Methods. *Journal of Neuroscience Methods*, 357, 109149. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109149

LÓPEZ, Begoña Giménez-Cassina *et al.* Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, v. 146, p. 174-180, 2014.

Lu, D. S., Chen, C., Zheng, Y. X., Li, D. D., Wang, G. Q., Liu, J., ... & Zhang, F. Combination treatment of icariin and L-DOPA against 6-OHDA-lesioned dopamine neurotoxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018; 11, 155.

Lu, W., Liu, X., Chen, S., Li, Z., & Wang, X. (2021). Identification of organic compounds in soil using FTIR spectroscopy: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 321-337.

LUNDBLAD M, ANDERSSON M, WINKLER C, KIRIK D, WIERUP N, CENCI M. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15, 120–132, 2002.

LUNDBLAD M, PICCONI B, LINDGREN H, CENCI MA. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease*, 16, 110-123, 2004.

MA, Xiaoyu; WANG, Juejin. Formononetin: A Pathway to Protect Neurons. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, p. 71, 2022.

Machado Dutra J., Espitia PJP, Andrade Batista R. (2021). Formononetina: efeitos biológicos e usos – uma revisão. *Química Alimentar*. 359 :129975. 10.1016/j.foodchem.2021.129975

MARINO, B. L., DE SOUZA, L. R., SOUSA, K., FERREIRA, J. V., PADILHA, E. C., DA SILVA, C. H., ... & HAGE-MELIM, L. I. Parkinson's disease: a review from pathophysiology to treatment. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2020; 20(9), 754-767.

Mellone M., Gardoni F. Glutamatergic mechanisms in L-DOPA-induced dyskinesia and therapeutic implications *J Neural Transm (Vienna)*, 125 (8) (2018), pp. 1225-1236

microglia and astrocytes play a role? *European Journal of Neuroscience* 2017; 45: 73-

MIRON, T.L.; PLAZA, M.; BAHRIM, G.; IBANEZ, E.; HERRERO, M. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Rev Journal of Chromatography A* 2011; 12(18): 4918-4927.

MORALES, I.; SANCHEZ, A.; RODRIGUEZ-SABATE, C.; RODRIGUEZ, M. The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. *Journal of Neurochemistry* 2016; 139:81-95.

MORAS, B., REY, S., VILAREM, G., & PONTALIER, P. Y. "Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and Soybean Protein Isolate." *Food Chemistry* 2017; 214 : 9-15.

MORGAN, J.C.; FOX, S. H. Treating the Motor Symptoms of Parkinson Disease. *Continuum (Minneapolis)* 2016; 22:1064–1085.

MULAS G., ESPA E., FENU S., SPIGA S., COSSU G., PILLAI E., ET AL. (2016). Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 286, 83–92.

NAGY, M., IMRE, S., & DELI, J. (2018). Development of an HPLC method for the identification and quantification of phenolic compounds in plant extracts. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 41(5-6), 292-297.

Nascimento GC, Bortolanza M, Bribian A, et al. Dynamic Involvement of Striatal NG2-glia in L-DOPA Induced Dyskinesia in Parkinsonian Rats: Effects of Doxycycline. *ASN Neuro*. 2023;15.

NAVAILLES, S.; BIOULAC, B.; GROSS, C.; DE DEURWAERDÈRE, P. Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2010; 38:136-43.

OERTEL, W., EGGERT, K., PAHWA, R., TANNER, C.M., HAUSER, R.A., TRENKWALDER, C., EHRET, R., AZULAY, J.P., ISAACSON, S., FELT, L., STEMPIEN, M.J. RANDOMIZED, placebo-controlled trial of ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2017; 32(12), 1701-1709.

of Parkinson's disease: Could targeting these pathways write a good ending? *Journal of Cellular Physiology* 2018; 234: 23-32.

OLIVEIRA, Marília R. *et al.* Amine-modified silica surface applied as adsorbent in the phenol adsorption assisted by ultrasound. *Chemical Engineering Communications*, v. 206, n. 11, p. 1554-1569, 2019.

PABON, M.M.; BACHSTETTER, A.D.; HUDSON, C.E.; GEMMA, C.; BICKFORD, P.C. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation* 2011;8:9.

PADOVAN-NETO FE, CAVALCANTI-KIWIATKOVSKI R, CAROLINO ROG, ANSELMO-FRANCI J, DEL BEL D. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 89:87-99, 2015.

PADOVAN-NETO FE, ECHEVERRY MB, CHIAVEGATTO S, DEL-BEL E. Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5:1-11, 2011.

PADOVAN-NETO FE, ECHEVERRY MB, TUMAS V, DEL-BEL EA. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 159:927-935, 2009.

PADOVAN-NETO FE, FERREIRA NR, DE OLIVEIRA-TAVARES D, DE AGUIAR D, DA SILVA CA, RAISMAN-VOZARI R, DEL BEL E. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. *Neuroscience Letters*, 541:126-31, 2013.

PANDEY, S.; SRIVANITCHAPOOM, P. Levodopa-induced Dyskinesia: Clinical Features, Pathophysiology, and Medical Management. *Annals of Indian Academy of Neurology* 2017; 20:190-198.

PAOLONE, Giovanna *et al.* Eltoprazine prevents levodopa-induced dyskinesias by reducing striatal glutamate and direct pathway activity. *Movement Disorders*, v. 30, n. 13, p. 1728-1738, 2015. Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 2015; 73:616-23.

parkinsonian rat. *Neurobiol Aging* 81, 190-199.

PAXINOS G., WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact Third Edition. New York: Academic Press, 1998.

Pérez-Martínez, M., Domínguez-Perles, R., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2020). Development of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of phenolic acids, flavonoids and their glycosides in different plant tissues. *Food chemistry*, 309, 125710. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125710>

PICCINELLI, AL.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, MC.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59: 6484-6891.

PICCONI, Barbara *et al.* Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Movement Disorders*, v. 33, n. 6, p. 867-876, 2018.

PISANU, Augusta *et al.* Neuroinflammation in L-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. *Journal of Neural Transmission* 2018; v. 125, p. 1287-1297.

Pourmirbabaei S, Dolatshah M., Rahmani F. Pathophysiological clues to therapeutic applications of glutamate mGlu5 receptor antagonists in levodopa-induced dyskinesia *Eur J Pharmacol*, 855:149-159 (2019).

RAMIREZ-CADAVIDA, D.A.; VALLES-RAMIREZA, S.; CORNISHA, K.; JÚNIOR MICHEL, F.C. Simultaneous quantification of rubber, inulin, and resins in *Taraxacum koksaghyz* (TK) roots by sequential solvent extraction. *Industrial Crops & Products* 2018; 122: 647–656.

REIS, J.H.O.; BARRETO, G.A.; CERQUEIRA, J.C.; ANJOS, J.P.D.; ANDRADE, L.N.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I.; MACHADO, B.A.S. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS One* 2019.

remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 2018

RIGHI, AA.; ALVES, TR.; NEGRI, G.; MARQUES, LM.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011; 91:2363-2370.

SANZ-BLASCO S, BORDONE MP, DAMIANICH A, GOMEZ G, BERNARDI MA, ISAJA L, TARAVINI IR, HANGER DP, AVALE ME, GERSHANIK OS, FERRARIO JE. The Kinase Fyn As a Novel Intermediate in L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2017

SAWADA, H.; OEDA, T.; KUNO, S.; NOMOTO, M.; YAMAMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; HISANAGA, K.; KAWAMURA, T. Amantadine Study Group. Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2010; 5:e15298.

SCHAPIRA, Anthony HV; CHAUDHURI, K. Ray; JENNER, Peter. Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2017; v. 18, n. 7, p. 435-450.

SCHWAB, R.S.; ENGLAND, A.C JR.; POSKANZER, D.C.; YOUNG, R.R. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of the American Medical Association* 1969; 208: 1168-1170.

SEBASTIANUTTO I, MASLAVA N, HOPKINS CR, CENCI MA. Validation of an improved scale for rating L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse and effects of specific dopamine receptor antagonists. *Neurobiology of Disease* 2016; 96:156-170.

SEBASTIANUTTO, I, CENCI, M.A. mGlu receptors in the treatment of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia *Curr Opin Pharmacol* 2018; 38:81-89.

SHARMA, V.; MISHRA, M.; GHOSH, S.; TEWARI, R.; BASU, A.; SETH, P.; SEM, E. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Research Bulletin* 2007; 73: 55-63.

SHARMA, V.D.; LYONS, K.E.; PAHWA, R. Amantadine extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2018; 14: 665-673.

SINGH, Shamsheer; KUMAR, Puneet. Piperine in combination with quercetin halt 6-OHDA induced neurodegeneration in experimental rats: Biochemical and neurochemical evidences. *Neuroscience research*, v. 133, p. 38-47, 2018.

STAYTE, S.; VISSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience* 2014; 8:113.

Sun, J., Wang, H., Wang, X., Zhou, J., Zhang, Y., & Liu, Y. (2021). Identification of phenolic compounds in teas by HPLC-ESI-MS and their free radical scavenging activities. *Food chemistry*, 334, 127546.

SUN, Xiu *et al.* Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain research bulletin*, v. 132, p. 10-19, 2017.

SZÁSZ, J. A., CONSTANTIN, V. A., ORBÁN-KIS, K., BANCU, L. A., BATAGA, S. M., CIORBA, M., ... & SZATMÁRI, S. Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease: observations and dilemmas after 10 years of real-life experience. *Pharmaceutics* 2022; 14(6), 1115.

Tian Z, Liu SB, Wang YC, Li XQ, Zheng LH, Zhao MG. Neuroprotective effects of formononetin against NMDA-induced apoptosis in cortical neurons. *Phytother Res*. 2013.

TIAN, Jiao; WANG, Xing-Qin; TIAN, Zhen. Focusing on formononetin: recent perspectives for its neuroprotective potentials. *Frontiers in Pharmacology* 2022; v. 13.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; DA ROCHA, P.F.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2006; 3:249-54.

VASCONCELOS, A.; NOVAIS, G. B.; SEVERINO, P.; MORAIS, R.; BARROSO, S. S.; SANTOS, S.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; COSTA, L. P.; BANI, C.; GOMES, M. Z.; Cardoso, J.C. In situ photocrosslinkable formulation of nanocomposites based on multi-walled carbon nanotubes and formononetin for potential application in spinal cord injury treatment. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **JCR** 2020..

VIVANCO-ESTELA, A.N.; PEREIRA, M. DOS S.; GUIMARAES, F.S.; DEL-BEL, E.; NASCIMENTO, G.C. DO. Cannabidiol has therapeutic potential for myofascial pain in female and male parkinsonian rats. *Neuropharmacology* 2021; 196: 108700

VOZARI RR, DEL-BEL E. L-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do

Wang J, Wu WY, Huang H, Li WZ, Chen HQ, Yin YY. Biochanin A Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Damage of Dopaminergic Neurons Both In Vivo and In Vitro via Inhibition of Microglial Activation. *Neurotox Res.* 2016 Oct;30(3):486-98.

Wang XS, Guan SY, Liu A, Yue J, Hu LN, Zhang K, Yang LK, Lu L, Tian Z, Zhao MG, Liu SB. Anxiolytic effects of Formononetin in an inflammatory pain mouse model. *Mol Brain.* 2019 Apr 8;12(1):36.

WANG, Jinchun *et al.* The protective effect of formononetin on cognitive impairment in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; v. 106, p. 1250-1257.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener.* 12:4-19, 2015; /

WINKLER C, KIRIK D, BJÖRKLUND A, CENCI MA. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-OHDA model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease*, 10, 165–186, 2002).

WOLF, Elisabeth *et al.* Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 25, n. 10, p. 1357-1363, 2010.

Wu, Y., Hu, F., Lu, J., Qu, W., Gao, Y., Liu, Y., & Huang, L. (2018). High-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector and electrospray ionization mass spectrometry to analyze polyphenols in propolis from different regions in China. *Journal of separation science*, 41(22), 4243-4253. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800477>

YOU, H.; MARIANI, L.L.; MANGONE, G.; LE FEBVRE DE NAILLY, D.; CHARBONNIER-BEAUPEL, F.; CORVOL, J.C. Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research* 2018; 373:111-135.

Yu L, Zhang Y, Chen Q, He Y, Zhou H, Wan H, Yang J. Formononetin protects against inflammation associated with cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2022 May;149:112836. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112836. Epub 2022 Mar 24. PMID: 35339827.

ZADA, Wahid *et al.* Fatty acid amide hydrolase inhibition and N-arachidonoyl ethanolamine modulation by isoflavonoids: A novel target for upcoming antidepressants. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 10, n. 5, p. e00999, 2022.

Zhang C, Zhu L, Lu S, Li M, Bai M, Li Y, Xu E. The antidepressant-like effect of formononetin on chronic corticosterone-treated mice. *Brain Res.* 2022 May 15;1783:147844. doi: 10.1016/j.brainres.2022.147844. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35218705.

Zhang, X., Ma, H., Yang, L., & Liu, M. (2021). Comparison of the Effect of 6-Hydroxydopamine Lesion Location on Motor Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Behavioural Brain Research*, 403, 113106. doi: 10.1016/j.bbr.2020.113106

Zhang, X., Yang, L., Ma, H., & Liu, M. (2022). Comparison of Two Forelimb-Use Tests in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 317, 109763. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109763

ZHAO, Y. *et al.* Thermal stability of thermosensitive chitosan-based hydrogels for biomedical applications: A study by thermogravimetry. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 137, p. 1041-1047, 2019.

Zhao, Y., Song, C., Chen, S., Xie, M., & Zhou, J. (2021). Using FTIR spectroscopy to identify and characterize organic compounds in soil. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 41-51.

Zheng C, Zhang F. New insights into pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurotoxicology.* 2021 Sep;86:104-113. doi: 10.1016/j.neuro.2021.07.006. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34331976.